

Université de Sherbrooke

**Photosensibilisation de l'ADN lié à la ménadione et à  
l'anthraquinone : oxydations, cassures et pontages interbrins**

par

**François Bergeron**

Département de médecine nucléaire et radiobiologie

Thèse présentée à la faculté de médecine et des sciences de la santé

en vue de l'obtention du grade de

philosophiae doctor (Ph.D.) en médecine nucléaire et radiobiologie

2006



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-30940-7*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-30940-7*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

## Résumé

L'ADN est une cible critique des radiations ionisantes puisque sa dégradation peut conduire à des mutations et mener ultimement aux processus de mort cellulaire et de cancérisation. L'effet des radiations ionisantes sur l'ADN est donc intensivement étudié, et beaucoup de connaissances sont disponibles sur la chimie de l'oxydation des composés modèles de l'ADN, c'est-à-dire ses constituants les plus simples (bases, nucléosides). Parmi les effets des radiations ionisantes, l'effet direct a pour conséquence la génération d'un radical cation des bases de l'ADN. Lorsque la base est libre, c'est-à-dire non intégrée à l'ADN, le radical de la base est impliqué dans plusieurs réactions chimiques qui mènent à la formation de produits d'oxydation stables de la base. Dans l'ADN, certains radicaux ont la propriété de se déplacer sur les bases voisines, loin de leur point d'origine. Ceci induit finalement un dommage sur une autre base que celle de départ lorsque le radical se convertit en produit final. Ce phénomène de migration, appelé transfert de charge (TC) dans l'ADN, est habituellement étudié au moyen d'un photosensibilisateur lié à l'ADN. Le photosensibilisateur, une fois excité, arrache un électron à une base proche de son point d'attache dans l'ADN, ce qui génère le radical cation. Les études de transfert de charge dans l'ADN ont montré que le dommage se stabilise préférentiellement sur les guanines, qui ont le potentiel d'oxydation le plus bas parmi les quatre bases. Les effets de séquences d'ADN, de structure tridimensionnelle, ainsi que d'autres paramètres ont été étudiés par différentes équipes qui ont permis l'avancement de la compréhension du phénomène de transfert de charge dans l'ADN. Cependant, même si une convergence est récemment constatée dans l'élaboration de la

théorie du transfert de charge, les mécanismes impliqués ne sont pas entièrement élucidés. Il apparaît que les résultats dépendent grandement du système chimique choisi pour étudier le transfert de charge dans l'ADN. De plus les approches choisies pour étudier ce processus n'ont pas fait appel à l'analyse des oxydations de l'ADN.

Dans un premier temps nous avons construit notre propre système d'étude du transfert de charges, en utilisant la ménadione comme photosensibilisateur lié à l'ADN. Les propriétés oxydantes de la ménadione ont été grandement utilisées pour l'étude de l'oxydation à un électron des constituants libres de l'ADN. La ménadione permet d'imiter efficacement l'effet direct des radiations ionisantes sur les nucléosides libres de l'ADN, puisque tout comme l'effet direct des radiations ionisantes, la ménadione génère le radical cation des quatre bases de l'ADN. La fixation de la ménadione dans l'ADN permet en plus de contrôler le point de départ de la migration, alors que les radiations ionisantes attaquent l'ADN de manière erratique. En utilisant notre ADN dans lequel la ménadione est insérée, nous avons constaté que le transfert de charge, bien qu'il conduise à l'oxydation des guanines de l'ADN, provoque aussi la dégradation des trois autres bases. On peut considérer que notre système permet de simuler au moins partiellement l'effet des radiations ionisantes sur l'ADN.

De plus, nous avons constaté dans ce même système, la génération spécifique du radical cation de l'adénine, et montré que celui-ci réagit fortement avec la ménadione pour mener à la formation efficace de produits de pontages interbrin dans l'ADN. Ces lésions, qui empêchent la dissociation des deux brins complémentaires, ont été caractérisées chimiquement.

Enfin, nous avons utilisé un photosensibilisateur autre que la ménadione : l'anthraquinone, qui est plus généralement employée dans les études de transfert de charge dans l'ADN, et nous avons montré que dans nos conditions d'étude ce photosensibilisateur provoque lui aussi la formation de dimères, après oxydation de la base thymine et réaction sur celle-ci.

La prise en compte de ces résultats permet d'éclairer la théorie du transfert de charge, premièrement en montrant que les quatre bases sont réactives lors du transfert de charge, et deuxièmement en insistant sur la réactivité des radicaux impliqués dans la formation des dimères.

**à mes parents, ma soeur,  
mes grands-parents.  
À Marie-Hélène, Chloé et Daphné.**

# Table des matières

|  |     |
|--|-----|
| Chapitre I : introduction.....   | 1   |
| I-1 Structure de l'ADN .....   | 2   |
| I-1.1 Structure linéaire .....   | 2   |
| I-1.2 Structure tridimensionnelle .....  | 3   |
| I-2 Oxydation à un électron des constituants de l'ADN.....   | 4   |
| I-2.1 Photochimie de la ménadione .....  | 4   |
| I-2.2 Voies de dégradation oxydative des bases de l'ADN .....  | 7   |
| I-3 Principales théories du transfert de charges dans l'ADN.....   | 16  |
| I-3.1 Transfert de charges par saut au travers des domaines d'ADN alignés .....  | 16  |
| I-3.2 Transfert de charges par saut du polaron .....   | 29  |
| I-4 Pontages interbrins dans l'ADN.....  | 39  |
| I-4.1 Pontages interbrins photoinduits ADN-ADN .....   | 40  |
| I-4.2 Pontage interbrins chimioinduits.....  | 46  |
| I-4.3 Stratégies de formation de pontages ADN-ADN.....   | 47  |
| Hypothèses-Objectifs.....  | 51  |
| Chapitre II : article 1- Nucleic Acids Res. 32, 6154-6163 (2004).....  | 54  |
| Chapitre III : article 2 - J. Am. Chem. Soc. 128, 14798-14799 (2006). ....   | 92  |
| Chapitre IV : article 3 - Accepté pour publication par Chem. Res. Toxicol. (2007).....   | 106 |
| Chapitre V : Sélection d'expériences non publiées .....  | 173 |
| V-1 Synthèse de la ménadione protégée.....   | 174 |
| V-2 Synthèse de l'acide 6-carboxylique de MQ par alkylation de .....   | 174 |
| Friedel-Crafts .....   | 174 |
| V-3 Synthèse d'un adduit Adénine-MQ sur le sucre .....   | 175 |
| V-4 Purification des oligonucléotides par différents traitements .....   | 175 |
| V-5 Digestion de l'ADN ponté par différents mélanges d'enzymes .....   | 176 |
| V-6 Comparaison de AQ et MQ .....  | 176 |
| V-7 Effet d'un sel de Lithium sur le transfert et les dimères induits par MQ .....   | 178 |
| V-8 Effet de la substitution d'une ou plusieurs adénines par une inosine en face de MQ<br>dans les duplexes où MQ est liée au centre ..... | 179 |
| V-9 Photolyse de duplexes liés à MQ et contenant 5-OHdUrd.....   | 179 |
| V-10 Effet de l'espaceur reliant MQ à l'ADN.....   | 180 |
| V-11 Photolyse d'un duplexe d'ADN contenant deux MQ.....   | 181 |
| V-12 Formation d'un adduit aminé de MQ-A lors de la photolyse.....   | 181 |
| Chapitre VI : Discussion.....  | 183 |
| VI-1 Liaison des quinones à l'ADN .....  | 184 |

|  |     |
|--|-----|
| VI-1.2 Liaison au centre des duplexes d'ADN .....  | 185 |
| VI-1.3 Liaison en bout de chaîne d'ADN .....   | 186 |
| VI-2 Pontages interbrins dans l'ADN lié aux quinones .....   | 186 |
| VI-2.1 Pontages dans l'ADN lié à MQ .....  | 186 |
| VI-2.2 Affinité de MQ pour A et de AQ pour T .....   | 188 |
| VI-2.3 AQ ne fait pas de pontages dans tous les duplexes (pourquoi l'équipe<br>de G.B. Schuster n'observe pas de produits de pontage?) ..... | 192 |
| VI-3 Transfert de charge dans l'ADN .....  | 194 |
| VI-3.1 Disparité des résultats selon les systèmes étudiés .....  | 194 |
| VI-3.2 Disparité de nos résultats dans nos systèmes étudiés .....  | 196 |
| VI-3.3 Transfert de charge dans l'ADN lié à AQ .....   | 198 |
| VI-3.4 Mécanisme de transfert de charge dans nos oligonucléotides modifiés .....   | 199 |
| VI-3.5 Facteurs (autres que la distance et la séquence) modulants le transfert .....<br>de charge dans l'ADN .....                           | 199 |
| VI-4 Oxydation de l'ADN par transfert de charge .....  | 205 |
| VI-4.1 Dommages à T .....  | 207 |
| VI-4.2 Dommages à A et C par transfert de charge .....   | 208 |
| VI-4.3 Particularités liées à l'étude du TC par électrophorèse .....   | 209 |
| Conclusion et perspectives .....   | 212 |
| Annexe : Clivage des Guanines oxydées dans l'ADN et visualisation des distances de<br>transfert .....  | 214 |
| Remerciements .....  | 216 |



## Liste des illustrations

|  |     |
|--|-----|
| Figure 1: structure et nomenclature d'un fragment d'ADN linéaire.....  | 3   |
| Figure 2 : coupe axiale d'un double brin d'ADN .....   | 4   |
| Figure 3 : structure de MQ et cycle oxydatif avec les nucléosides.....   | 6   |
| Figure 4 : diagramme de type Jablonsky pour un photosensibilisateur.....   | 7   |
| Figure 5 : oxydation des pyrimidines par hydratation du radical cation.....  | 9   |
| Figure 6 : oxydation des pyrimidines par déprotonation du radical cation.....  | 11  |
| Figure 7: oxydation à un électron de dGuo et de 8-oxodGuo.....   | 13  |
| Figure 8: oxydation à un électron de l'Adénine.....  | 15  |
| Figure 9: quelques structures chimiques des accepteurs/donneurs d'électrons et bases<br>rapporteuses utilisés par l'équipe de J.K. Barton.....                 | 18  |
| Figure 10 : méthodologie de flash-quench avec le complexe métallique de Ruthénium.   | 22  |
| Figure 11: conséquence sur le transfert de charge de la rupture de l'empilement $\pi$ .....  | 24  |
| Figure 12 : l'anthraquinone (AQ) et ses modes de liaison à l'ADN.....  | 30  |
| Figure 13 : quelques séquences utilisées par l'équipe de G.B. Schuster. ....   | 32  |
| Figure 14: potentiels d'oxydation calculés pour des courtes séquences d'ADN.....   | 35  |
| Figure 15 : précurseur, radical et pontage décrits par Greenberg et al .....   | 41  |
| Figure 16: pontages détectés dans l'ADN-A. ....  | 42  |
| Figure 17: pontages impliquant la 5MQ .....  | 45  |
| Figure 18: mécanisme de bisalkylation par les méthides de quinone .....  | 46  |
| Figure 19: intercalation d'un psoralène dans l'ADN et réaction avec une ou deux Thd  | 47  |
| Figure 20 : à gauche, dimère T <sup>+</sup> T avant son insertion dans l'ADN, à droite, schéma de<br>synthèse des oligonucléotides incorporant le pontage..... | 49  |
| Figure 21 : structure de 5a .....  | 182 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 22: compétition des réactions lors de la formation de pontages MQ <sup>A</sup> dans l'ADN..... | 189 |
| Figure 23: réactions en compétition durant le transfert de charge dans l'ADN induit par un PS. ....   | 200 |
| Figure annexe 1: élimination $\beta$ induite par une amine.....                                       | 215 |

## Liste des abbréviations

|                   |  |
|-------------------|--|
| <sup>3</sup> MQ   | état triplet de ménadione  |
| 5-FordUrd         | 5-formyl-2'-désoxyuridine  |
| 5-HMdUrd          | 5-(hydroxyméthyl)-2'-désoxyuridine   |
| 5-HMUra           | 5-hydroxyméthyluracile   |
| 5-OHCyt           | 5-hydroxycytosine  |
| 5-OHdCyd          | 5-hydroxy-2'-désoxycytidine  |
| 5-OHdUrd          | 5-hydroxy-2'-désoxyuridine   |
| 5-OHUra           | 5-hydroxyuracile   |
| 8-oxodAdo         | 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyadénosine   |
| 8-oxodGuo         | 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine   |
| A                 | adénine  |
| Aox               | produit d'oxydation de A   |
| ADN               | acide 2'-désoxyribonucléique   |
| AQ                | anthraquinone  |
| AQ <sup>^</sup> A | dimère de AQ avec A  |
| AQ <sup>^</sup> T | dimère de AQ avec T  |
| BET               | transfert inverse d'électron   |
| BrU               | 5-bromouracile   |
| C                 | cytosine   |
| CHLP-UV-EC        | chromatographie liquide haute performance couplée<br>à la détection par ultra-violets et par électrochimie |
| CIS               | conversion intersystème  |
| <sup>CP</sup> A   | N <sup>6</sup> -cyclopropylamine-adénine   |
| <sup>CP</sup> C   | N <sup>4</sup> -cyclopropylamine-cytosine  |
| <sup>CP</sup> G   | N <sup>2</sup> -cyclopropylamine-guanosine   |
| dAdo              | 2'-désoxyadénosine   |
| dCyd              | 2'-désoxycytidine  |
| dGuo              | 2'-désoxyguanosine   |
| DMT               | diméthoxytrityle   |
| dR                | 2-désoxyribose   |
| dUrd              | 2'-désoxyuridine   |

|          |   |
|----------|---|
| endo III | endonucléase III  |
| ENH      | électrode normale à hydrogène   |
| FapydAdo | 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine de dAdo                             |
| FapydGuo | 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine de dGuo                   |
| Fpg      | <i>N</i> -glycosylase des formamidopyrimidines                        |
| G        | guanine   |
| Gox      | Produit d'oxydation de G  |
| MQ       | ménadione   |
| MQ^A     | dimère de MQ avec A   |
| MQ^I     | dimère de MQ avec I   |
| MQ^T     | dimère de MQ avec T   |
| P1       | nucléase P1   |
| PA       | phosphatase alcaline  |
| PII      | phosphodiesterase II  |
| PS       | photosensibilisateur  |
| pyBOP    | hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxy-tripyrrolidinophosphonium |
| REB      | réparation par excision de bases                                      |
| REN      | réparation par excision de nucléotides                                |
| S1       | état excité singulet  |
| SVP      | phosphodiesterase de venin de serpent                                 |
| T        | thymine   |
| T^T      | dimère de thymines  |
| T1       | état excité triplet   |
| TBDMS    | <i>tert</i> -butyldiméthylsilyle                                      |
| TC       | transfert de charge   |
| Thd      | thymidine   |
| UVA      | rayonnement ultraviolet de type A                                     |

## **Chapitre I : introduction**

## I-1 Structure de l'ADN

### I-1.1 Structure linéaire

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est, dans la cellule, le support de l'information génétique. C'est un polymère formé de deux brins anti-parallèles enroulés en hélice. Chaque brin est composé de la répétition de quatre types de sous-unités appelées nucléotides. Un nucléotide contient un sucre qui relie un groupement phosphate à une base azotée (**Figure 1**). Le sucre est un 2-desoxyribose, c'est à dire un sucre à cinq carbones. (Par convention, la numérotation des carbones du sucre est suivie par le symbole ' (prime), par exemple C1', C2' désignent les carbones 1 et 2 du sucre). Dans l'ADN, le C2' du sucre est toujours exempt de fonction alcool, c'est pourquoi il est appelé désoxyribose. La base azotée est reliée au sucre sur le C1', et cette liaison, impliquant à chaque fois un azote de la base, est une liaison *N*-glycosidique. Dans le brin d'ADN les positions C5' et C3' du sucre portent chacune un groupement phosphate, au moyen d'une liaison phosphodiester. L'alternance d'un sucre et d'un phosphate forme le squelette de l'ADN. La description de la séquence de l'ADN se fait habituellement en partant de l'extrémité 5' vers 3' (**Figure 1**).

Les quatre bases azotées sont de deux types : purines et pyrimidines. L'adénine et la guanine sont des purines tandis que la thymine et la cytosine sont des pyrimidines. Ces bases sont respectivement notées A, G, T et C. Lorsque les bases sont liées aux 2-desoxyriboses, les nucléosides sont appelés respectivement 2'-désoxyadénosine (dAdo), 2'-désoxyguanosine (dGuo), thymidine (Thd) et 2'-désoxycytidine (dCyd).

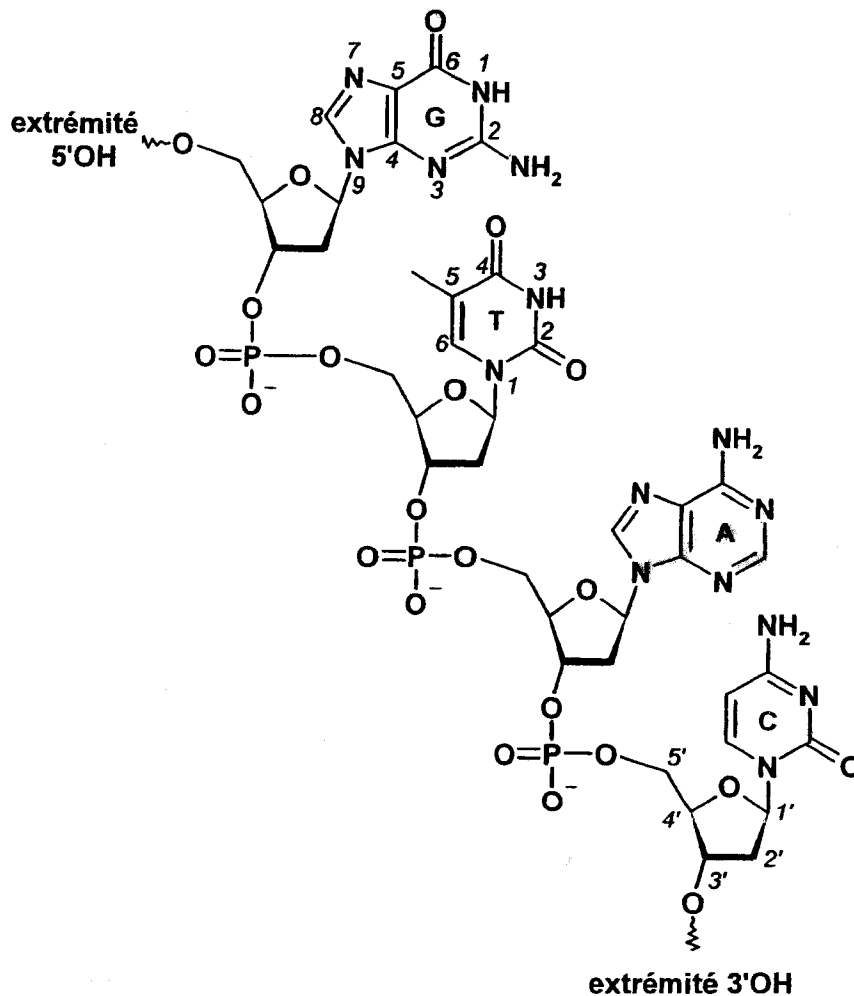
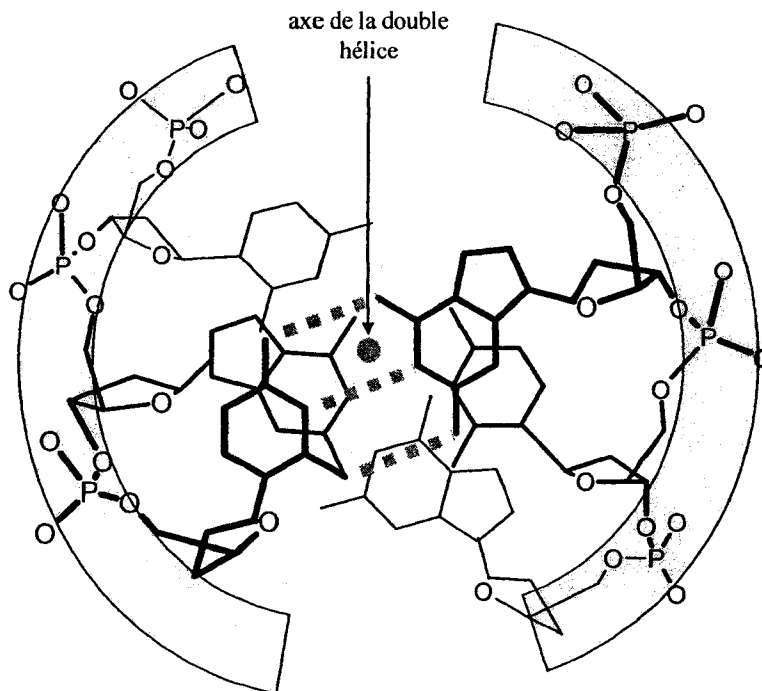


Figure 1: structure et nomenclature d'un fragment d'ADN linéaire.

### I-1.2 Structure tridimensionnelle

Dans l'ADN double brin normal, chaque purine fait face à une pyrimidine, de la façon suivante : A en face de T, C en face de G. Les deux brins d'ADN parfaitement appariés sont appelés brins complémentaires. Il n'y a pas de liaison covalente reliant ces deux brins, qui sont maintenus ensemble par trois liaisons hydrogène existant entre G et C, et aux deux liaisons entre A et T. C'est l'enroulement antiparallèle des deux brins complémentaires qui forme la double hélice d'ADN. Dans cette structure

tridimensionnelle, les bases se retrouvent à l'intérieur de l'hélice tandis que le squelette sucre-phosphate est à l'extérieur (**Figure 2**). 10,4 paires de nucléotides sont nécessaires pour avoir un tour d'hélice, ce qui fait que l'angle entre les bases consécutives est d'environ  $36^\circ$ . La distance séparant le centre de chaque nucléotide sur un même brin est de 3.4 Å.



**Figure 2 : coupe axiale d'un double brin d'ADN (adapté de (Alberts et al. 1994))**

## **I-2 Oxydation à un électron des constituants de l'ADN**

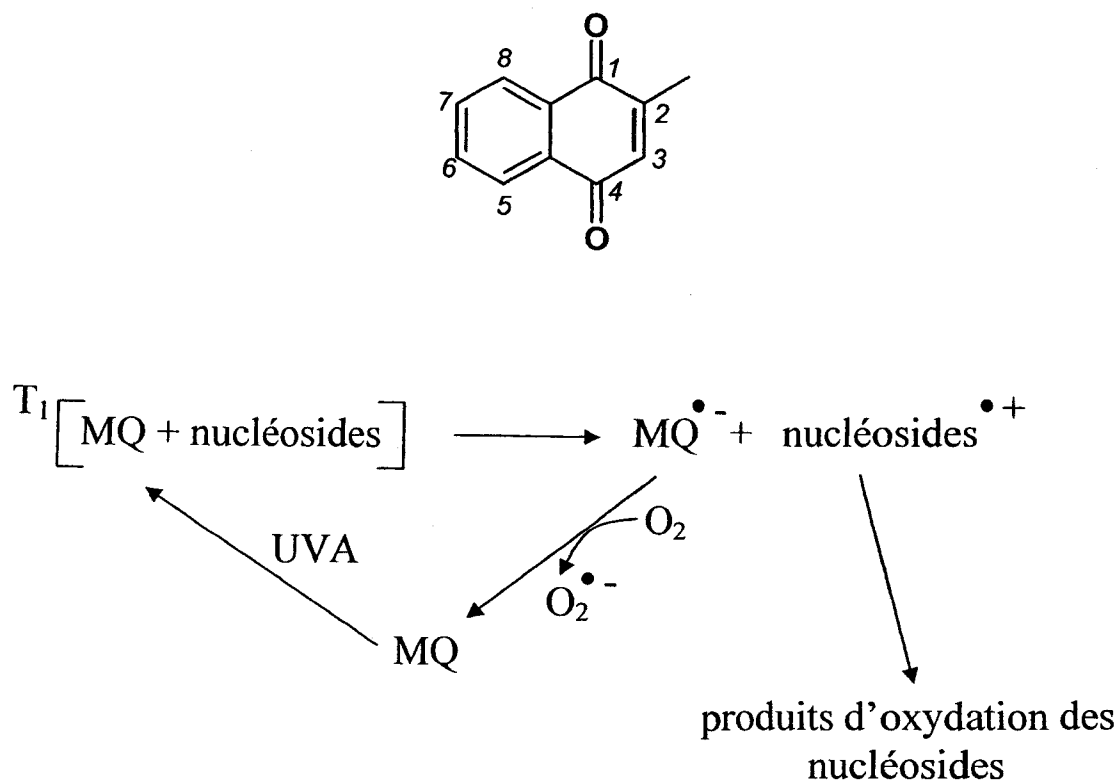
### **I-2.1 Photochimie de la ménadione**

L'ADN est un substrat pour de nombreux agents oxydants (Cadet et al. 1997). Parmi ceux-ci, les radiations ionisantes, par l'effet direct, et la photosensibilisation de type I génèrent des oxydations à un électron de l'ADN.



La compréhension des voies de formation des dommages à l'ADN a été facilitée par l'élucidation des mécanismes de dégradation des composés modèles de l'ADN. On entend par composés modèles de l'ADN ses constituants les plus simples : bases, nucléosides, nucléotides. L'étude de l'oxydation à un électron de ces composés a été réalisée selon différents protocoles, incluant l'oxydation par des radicaux inorganiques ( $\text{Br}_2^-$ ,  $\text{SO}_4^-$ ), ou encore l'oxydation par la ménadione (MQ, 2-méthyl-naphthoquinone, voir structure à la **Figure 3**), un photosensibilisateur activé par le rayonnement UVA.

MQ est une quinone dérivée de la vitamine K. Elle se présente sous la forme d'une poudre jaune, ou de cristaux en aiguille, et est très peu soluble dans l'eau (saturation à 0.8 mM). Le spectre d'absorption UV de MQ possède deux maxima autour de 260 et 340 nm respectivement. La photosensibilisation par la ménadione des composés modèles de l'ADN en solution s'est avérée être une méthode efficace pour générer les radicaux cations des quatre bases, et une grande partie des études destinées à élucider les mécanismes d'oxydation à un électron des constituants de l'ADN a été effectuée en utilisant la ménadione comme photosensibilisateur de type I (Decarroz et al. 1986; Fisher et Land. 1983; Wagner et al. 1984; Wagner et al. 1990a; Wagner et al. 1990b; Wagner et al. 1990; Wagner et al. 1994; Wagner et al. 1999). L'ADN n'absorbe pas au delà de 300 nm c'est pourquoi lors de la photolyse des composés modèles de l'ADN par MQ, la longueur d'onde choisie pour photoexciter MQ se situe dans l'UV proche autour de 340 nm (généralement 365 nm) afin de ne pas exciter l'ADN par effet direct. En absorbant un photon, MQ passe d'un état stable singulet  $S_0$  à un état excité singulet  $S_1$  de plus haute énergie (**Figure 4**). Un croisement intersystème (CIS) peut alors s'opérer très rapidement (quelques picosecondes) pour convertir l'état singulet excité  $S_1$  en état triplet  $T_1$ . Le

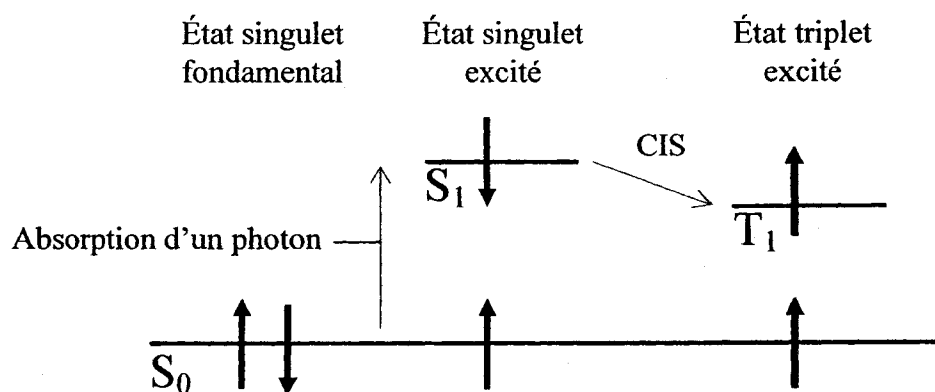


**Figure 3 : structure de MQ et cycle oxydatif avec les nucléosides.**

rendement quantique de formation de l'état triplet de MQ ( $^3MQ$ ) par CIS est de 0.66. Les états excités  $S_1$  et  $T_1$  sont tous deux énergétiquement capables d'induire l'arrachement d'un électron à chacun des quatre nucléosides de l'ADN cependant les radicaux formés à l'état singulet vont se recombiner rapidement avec une probabilité faible de donner des produits, tandis que les radicaux formés à l'état triplet (après le CIS) auront plus de chance de se séparer pour donner des produits d'oxydation des nucléosides. La recombinaison des espèces radicalaires nuit aux rendements de formation des produits d'oxydation, c'est pourquoi généralement un photosensibilisateur efficace doit avoir un CIS rapide. L'équation de Weller confirme la capacité de  $^3MQ$  à oxyder les quatre nucléosides (Mac et Wirz. 2002). MQ est régénérée par sa réaction avec l'oxygène, ce qui permet d'une part qu'une molécule de MQ oxyde plusieurs nucléosides (**Figure 3**), et

d'autre part évite que le radical anion de MQ ne se recombine avec le radical cation du nucléoside qu'elle vient de créer.

L'oxydation des composés modèles de l'ADN par effet direct passe par la génération du radical cation des bases. De par sa capacité d'induire le radical cation des quatre bases de l'ADN, la photolyse en présence de MQ permet de simuler l'effet direct des radiations ionisantes sur les bases.



**Figure 4 : diagramme de type Jablonsky pour un photosensibilisateur. Les flèches épaisses indiquent les spins des électrons.**

## I-2.2 Voies de dégradation oxydative des bases de l'ADN

### I-2.2.1 Oxydation des pyrimidines

Le canevas général de l'oxydation à un électron des nucléosides est le suivant : le point de départ est la formation du radical cation de la base (**Figure 3**). Ensuite, ce radical suit deux voies de réaction compétitives en solution: la déprotonation et l'hydratation (**Figures 5 et 6**). Les voies d'oxydation de Thd 1 et de dCyd 2 sont semblables en ce qui

concerne l'hydratation du cation radical des bases respectives et sa transformation en produits stables. L'hydratation du cation radical de dThd **3** sur le C6 mène au radical 6-hydroxy-5,6-dihydrothymidin-5-yle **4**, tandis que l'hydratation du cation radical de dCyd **5** conduit à l'équivalent radicalaire **6**. L'existence des ces radicaux centrés en C5 a été anticipée au vu de la formation des produits stables respectifs (Wagner et al. 1990a), et la formation transitoire des radicaux a été ensuite confirmée par ESR (Krishna et al. 1987). L'addition d'oxygène moléculaire sur les C5 de **4** et **6** donne naissance aux peroxydes radicalaires **7** et **8**. Ceux-ci sont réduits par l'anion superoxyde ce qui conduit aux quatre diastereoisomères *cis* et *trans* de 5-hydroperoxy-6-hydroxy-5,6-dihydrothymidine **9** et 5-hydroperoxy-6-hydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidine **10** respectivement. La caractérisation complète par RMN des quatre hydroperoxydes **9** ainsi que l'étude de leur voie de décomposition en solution a été effectuée (Wagner et al. 1990; Wagner et al. 1994). À l'inverse, l'instabilité des hydroperoxydes de dCyd **10** n'a pas permis leur caractérisation. Le réarrangement du cycle pyrimidique de **9** et **10** conduit au même formamide **11** et aux deux diastéréoisomères de l'hydantoïne **12** et **13**. Les quatre diastéréoisomères des glycols de Thd **14** et de dCyd **15** proviennent du clivage hydrolytique de la fonction C5 des peroxydes. La désamination des glycols **15** mène à la formation des glycols de 2'-désoxyuridine **16**. Les produits stables **17** et **18** (5-hydroxy-2'-désoxycytidine (5-OHdCyd) et 5-hydroxy-2'-désoxyuridine (5-OHdUrd)) sont issus de la déshydratation de **15** et **16** respectivement (Tremblay et al. 1999).

La voie de déprotonation du radical cation de Thd et de dCyd diffère pour les deux bases (**Figure 6**), puisque la déprotonation de **3** est exclusive au méthyle porté par le C5, tandis que **5** peut subir une déprotonation soit de l'amine exocyclique de la base soit du C1' du

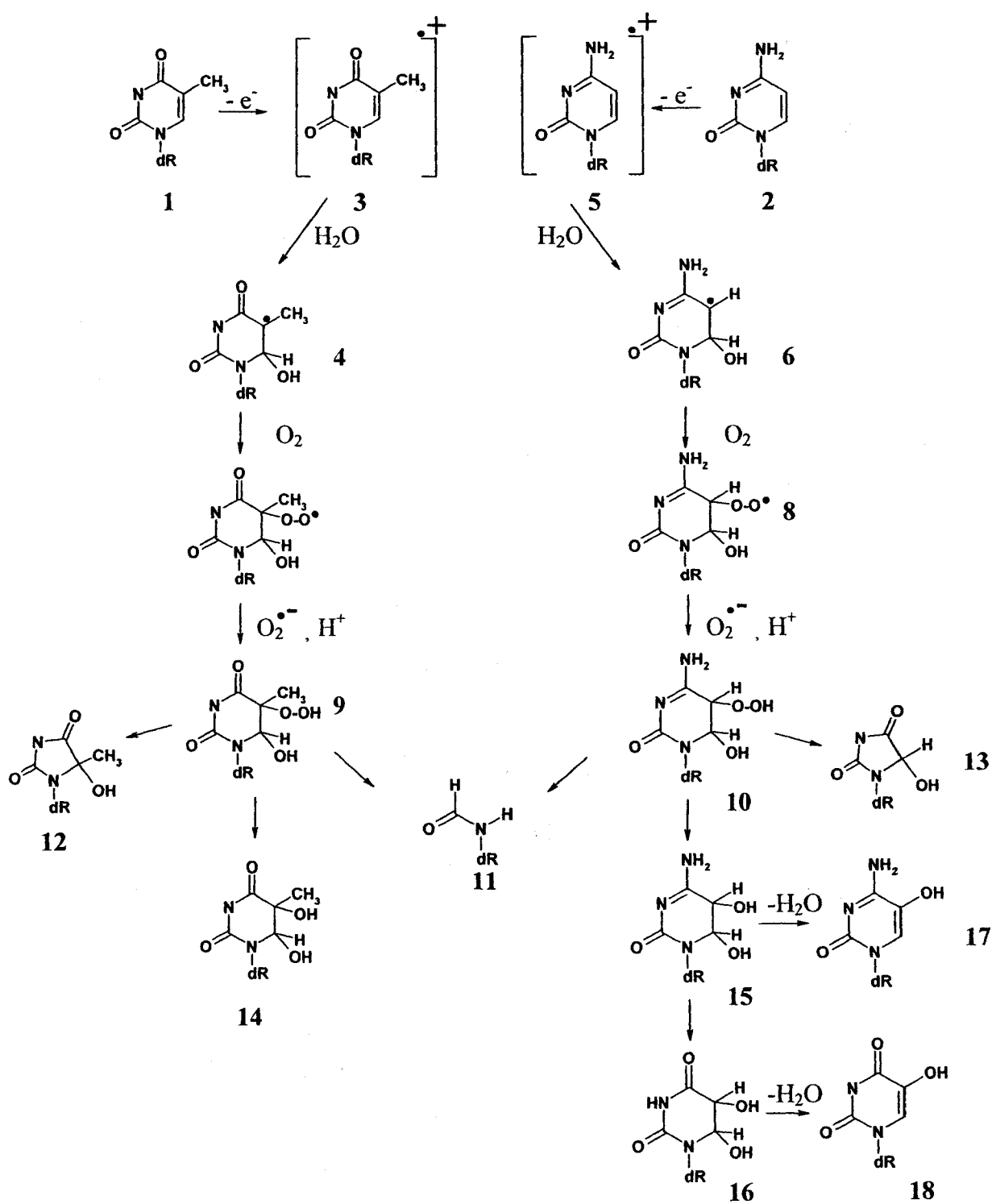


Figure 5 : oxydation des pyrimidines par hydratation du radical cation  
(adapté de (Cadet et al. 1997; Douki et al. 2004))

sucre. Il est estimé que le radical **3** suit la voie de protonation dans 40% des cas, ce qui fournit le radical 5-(2'-desoxyuridyle)méthyle **19**. La formation de ce radical a aussi été confirmée par spectroscopie ESR (Krishna et al. 1987). L'addition de l'oxygène moléculaire sur **19** puis la réduction du radical peroxyde **20** par l'anion superoxyde conduit à la 5-(hydroperoxyméthyl)-2'-désoxyuridine **21**, dont la décomposition fournit la 5-(hydroxyméthyl)-2'-désoxyuridine **22** (5-HMdUrd) et dans une moindre mesure la 5-formyl-2'-désoxyuridine **23** (5-FordUrd).

La déprotonation en C1' de **5** conduit à la libération de la base cytosine en solution, et à la formation concomitante de la 2-désoxyribonolactone **24**. La déprotonation de la base donne lieu à la formation du radical aminyle **25**, qui se désamine en dUrd **26**. La dépyrimidinisation de dCyd est un phénomène minoritaire dans ces conditions, puisque la cytosine compte pour seulement 4% des dommages totaux à dCyd.

#### ***I-2.2.2 Oxydation à un électron comparée à la radiolyse des pyrimidines***

Le bilan oxydatif de la perte d'un électron suivi d'une hydratation (c'est-à-dire le passage de **1** à **4** par exemple) est le même que celui résultant de l'ajout d'un radical OH. Les radicaux OH ont la faculté de s'ajouter sur le C6 mais aussi sur le C5 des pyrimidines, ce qui engendre la formation des radicaux 5-hydroxy-5,6-dihydrothymidin-6-yl et 5-hydroxy-5,6-dihydrocytidin-6-yl, centrés sur le C6. À l'inverse, ces derniers sont peu formés lors de la photolyse en présence de ménadione, qui produit presque exclusivement les radicaux centrés sur le C5. Le réarrangement du cycle du peroxyde provenant du radical centré en C6 de la dCyd fournit une série de produits spécifiques à ce radical (Cadet et al. 1997) et, dans le cas de Thd le radical hydroxylé centré en C6

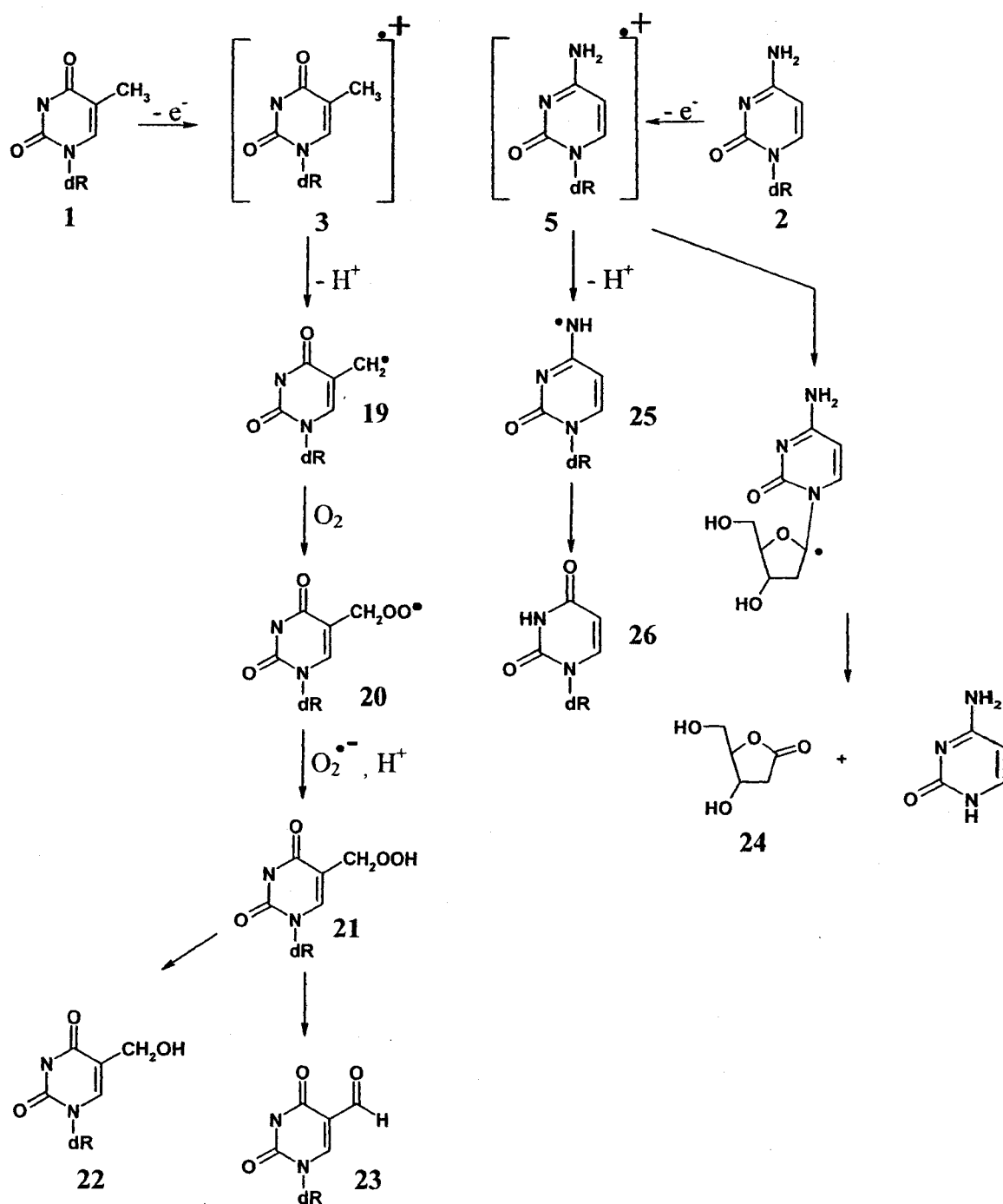


Figure 6 : oxydation des pyrimidines par déprotonation du radical cation.  
(adapté de (Cadet et al. 1997; Douki et al. 2004))

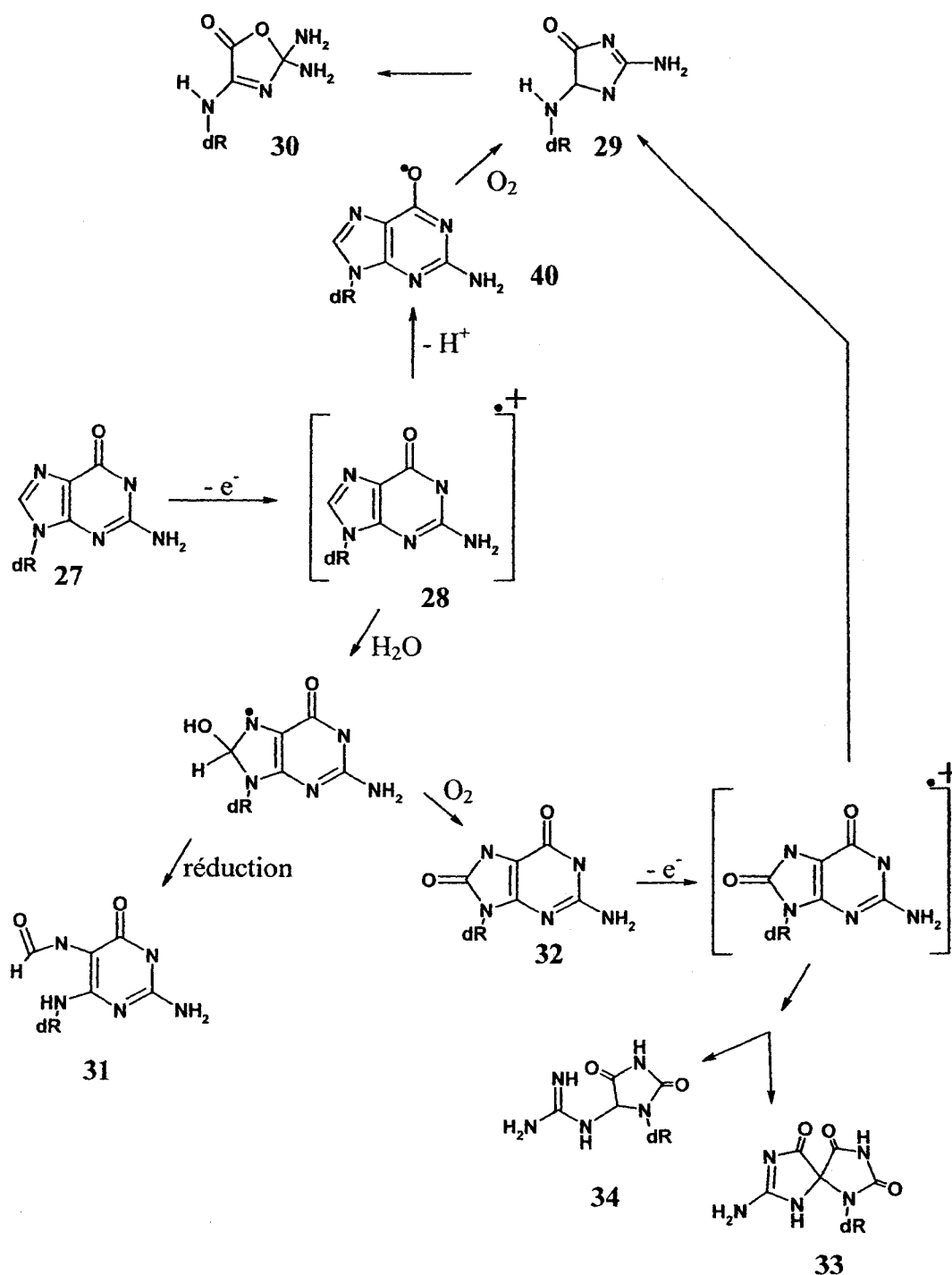
mène à l'acide 5-hydroxy-5-méthylbarbiturique (non représenté). Ces produits sont des marqueurs de la radiolyse de dCyd et de Thd, et beaucoup moins de la photosensibilisation par la ménadione.

De même, l'abstraction d'hydrogène sur Thd par le radical OH issu de la radiolyse de l'eau est de 5%, tandis que la déprotonation de **3**, décrite plus haut et qui va mener aux mêmes produits, compte pour 40%.

### *I-2.2.3 Oxydation des purines*

La guanine est la base la plus facilement oxydable dans l'ADN, avec un potentiel d'oxydation mesuré de 1.3V contre l'ENH (Steenken et Jovanovic. 1997). Les potentiels d'oxydation de Thd, dCyd, et dAdo sont respectivement de 1.8, 1.7 et 1.4 V. La photolyse d'une solution de ménadione et de dGuo **27** ne fournit pas de bons rendements de produits d'oxydation du nucléoside (Douki et Cadet. 1999) car le transfert de charge (TC) qui provoque la formation du radical cation **28** et du radical anion de MQ est réversible pour donner les espèces de départ MQ et dGuo. L'étude de la formation des produits d'oxydation à un électron de la guanine a été effectuée en utilisant divers agents chimiques ou bien différents procédés physiques (Douki et al. 2004). Les produits d'oxydation de dGuo induits par l'addition du radical OH sont les mêmes que les produits d'oxydation à un électron de dGuo (Cadet et al. 1997). La déprotonation du radical cation **28** conduit après réarrangement à la 2'-désoxyimidazolone de dGuo **29**, qui se stabilise subséquemment en 2'-désoxyoxazolone **30** (oxazolone). La caractérisation de ces deux derniers produits ainsi que l'élucidation de leurs mécanismes de réarrangement a été effectuée (Cadet et al. 1994). L'hydratation du radical cation **28** engendre un

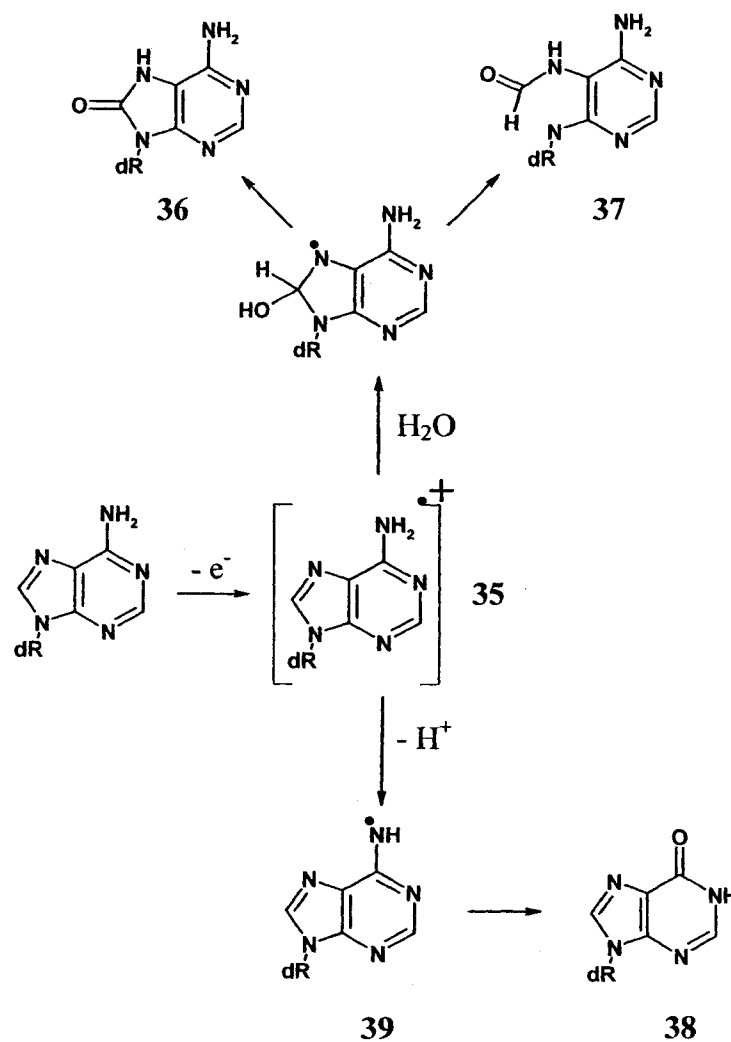




**Figure 7: oxydation à un électron de dGuo et de 8-oxodGuo**  
(adapté de (Cadet et al. 1997; Douki et al. 2004))

intermédiaire radicalaire 8-hydroxy-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosyle qui peut être aussi formé par addition du radical OH en position 8 de dGuo. La réduction de ce radical conduit à la formation de Fapy-dGuo **31**, tandis que son oxydation génère la 8-oxodGuo **32** en milieu aéré. En partant du nucléoside libre ou bien de l'ADN simple brin la formation de 8-oxodGuo est minime, alors qu'elle est favorisée dans l'ADN double brin. La 8-oxodGuo **32** est, à son tour, la cible d'oxydations. Son potentiel d'oxydation, plus bas que celui de dGuo (0.8 V contre l'ENH), en fait un site de terminaison du transfert de charge dans l'ADN. Les produits d'oxydation à un électron de la 8-oxodGuo sont principalement les diastéréoisomères des spiroiminodihydantoïnes **33** et des guanidinohydantoïnes **34** (Douki et al. 2004).

L'hydratation du radical cation de dAdo **35** mène à la formation de 8-oxodAdo **36** en conditions oxydantes, et à la formation de Fapy-dAdo **37** en conditions réductrices (en conditions désaérées), tandis que la 2'-désoxyinosine **38** provient de la protonation du radical cation de dAdo **35** suivie de la désamination du radical neutre **39** qui en découle. Tout comme pour dGuo, les produits d'oxydation à un électron de dAdo sont les mêmes que les produits d'oxydation engendrés par les radicaux OH.



**Figure 8: oxydation à un électron de l'Adénine**  
(adapté de (Cadet et al. 1997; Douki et al. 2004))

### **I-3 Principales théories du transfert de charges dans l'ADN**

Les deux principales théories de transfert de charge sont abordées dans cette partie en présentant brièvement les expériences les plus pertinentes à leur établissement. Ces deux théories, qui sont les plus décrites, proviennent des travaux des équipes de J.K. Barton et de G.B. Schuster respectivement. D'autres équipes de recherche ont aussi contribué à l'avancement de la compréhension du processus de transfert de charge dans l'ADN mais leurs travaux ne sont pas détaillés ici.

#### **I-3.1 Transfert de charges par saut au travers des domaines d'ADN alignés**

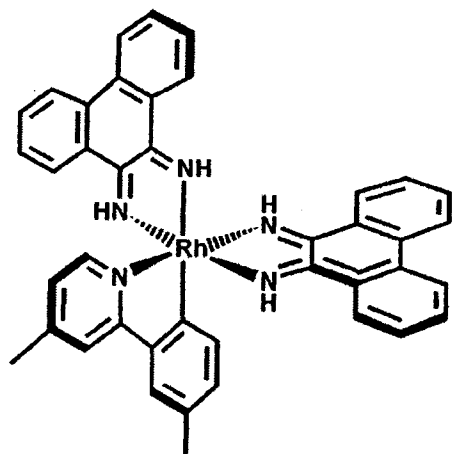
C'est la théorie développée par l'équipe de J.K. Barton, qui utilise une panoplie d'oxydo-réducteurs intercalés dans l'ADN. Les phénomènes de transfert de charge sont étudiés à la fois par spectroscopie pour mesurer les étapes rapides ainsi que par mesure des produits finaux (électrophorèse, CHLP) afin de connaître les effets du transfert après stabilisation des espèces chimiques.

##### ***I-3.1.1 Transfert d'électron n'oxydant pas l'ADN***

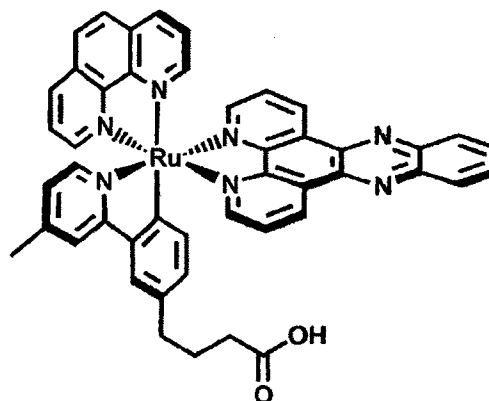
###### **I-3.1.1.1 Rôle clé de l'empilement dans l'ADN des donneurs et accepteurs de charge**

Les expériences pionnières d'étude du transfert de charge dans l'ADN menées par Barton ont eu pour but d'établir les propriétés conductrices de l'ADN, sans étudier l'oxydation des bases nucléiques (O'Neill et Barton. 2004b). Dans cette optique, en 1993, est réalisée la première mesure de transfert d'électron en solution dans une séquence d'ADN synthétique connue. Le duplexe d'ADN, de 15 bases de long (50 Å), est lié à

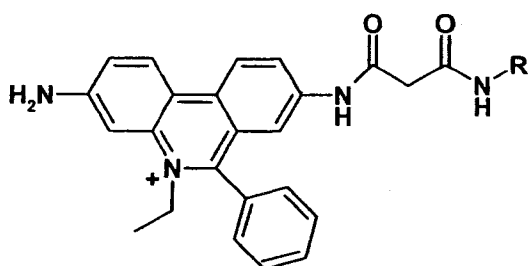
chacune de ses extrémités 5' à un métalointercalant, de façon covalente. Les métalointercalants utilisés sont non seulement liés à l'ADN mais leur intercalation parfaite dans l'empilement  $\pi$  est vérifiée (Murphy et al. 1993). Le métalointercalant donneur d'électron est un complexe de Ruthénium chélaté (le bis(phenantroline)(dipyridophenazine) Ruthenium II,  $\text{Ru(phen)}_2\text{dppz}^{2+}$ ) (**Figure 9**). Il devient donneur d'électron quand il est photoexcité dans le visible. En absence d'un accepteur d'électron il revient à l'état stable par l'émission d'un photon, mais en présence d'un accepteur d'électron qui a un potentiel de réduction approprié et avec lequel il peut physiquement interagir il transfère un électron à l'accepteur. L'accepteur d'électron lié à l'ADN est un complexe métallique de Rhodium III, le  $\text{Rh(phi)}_2\text{phen}^{3+}$ . Dans l'eau sans ADN, la luminescence du Ru(II) photoexcité est très peu annihilée par le Rh(III) : il n'y a pas de transfert de charge entre les deux métaux. Par contre lorsque les complexes métalliques sont reliés par l'ADN il n'y a plus de luminescence détectable provenant de Ru(II). L'ADN a donc servi de milieu conducteur à l'électron. Lorsque les métaux Ru(II) et Rh(III) sont liés à l'ADN par l'intermédiaire de chélateurs qui ne peuvent pas s'intercaler dans l'empilement  $\pi$  ( $\text{Ru(phen)}_3^{2+}$  et  $\text{Rh(phen)}_3^{3+}$ ), il n'y a plus de transfert de charge détecté, ce qui suggère que les métaux doivent être dans l'empilement  $\pi$  pour réaliser le transfert d'électron dans l'ADN. L'étude du transfert de charge réalisée dans cette étude par des méthodes spectroscopiques permet aussi d'établir que le transfert se réalise avec un taux de  $10^{10}$  par seconde.



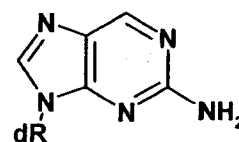
Complexe de  
Rhodium



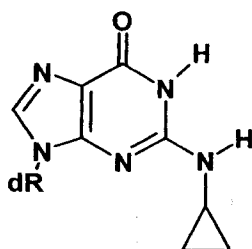
Complexe de  
Ruthénium



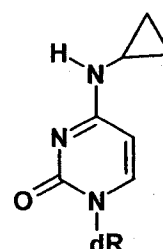
Éthidium



2-Aminopurine



CP<sub>G</sub>



CP<sub>C</sub>

**Figure 9: quelques structures chimiques des accepteurs/donneurs d'électrons et bases rapporteuses utilisés par l'équipe de J.K. Barton pour l'étude du transfert de charges dans l'ADN. D'après (O'Neill et Barton. 2004b; Shao et al. 2005).**

### **I-3.1.1.2 Effet de la distance et de l'empilement des bases**

#### **sur le transfert de charges**

L'influence, sur le transfert de charge, de l'empilement des bases ainsi que de la distance séparant le donneur et l'accepteur d'électron a été testée (Kelley et al. 1997). L'éthidium, un intercalant de l'ADN est, dans ce cas, le donneur d'électron qui est relié chimiquement à l'ADN (**Figure 9**). L'éthidium a le même potentiel d'oxydation que le donneur Ru(II) mais son intercalation est moins bonne (Holmlin et al. 1997). L'accepteur d'électron est le Rh(III), chélaté avec d'autres groupements que dans l'expérience précédente, mais parfaitement intercalé dans le duplexe d'ADN. L'efficacité de l'accepteur Rh(III) à annihiler la fluorescence de l'éthidium photoexcité est plus faible que lorsque le donneur est le Ru(II). Ceci est expliqué par la moins bonne intercalation de l'éthidium et confirme l'importance de l'intercalation des entités qui s'échangent les électrons. De façon plus drastique, l'insertion d'un mésappariement A-C (adénine-cytosine), qui déforme l'ADN, à la place de A-T, diminue l'efficacité du transfert de 80%, montrant cette fois que l'interruption de l'empilement  $\pi$  nuit au transfert de charge. La variation de la distance d'ADN de 17 à 36 Å (5 à 11 bases) entre le donneur et l'accepteur ne montre qu'une faible influence de la distance sur le transfert. Cette dépendance sur la distance, bien que faible pour ces courtes séquences, est expliquée par la diminution de probabilité d'avoir toutes les bases alignées dans l'empilement  $\pi$  lorsque le nombre de bases augmente.

### ***I-3.1.2 Transfert d'électron oxydant l'ADN***

Dans cette série d'expériences plus récentes, le donneur d'électron est la guanine, seule ou en paire.

#### **I-3.1.2.1 Effet du transfert interbrin**

En 1999, Barton étudie l'oxydation de la guanine par transfert de charge dans l'ADN, toujours en utilisant la méthode d'annihilation de fluorescence (quenching) (Kelley et Barton. 1999). À l'inverse de ce qui a été vu précédemment, le transfert de charge étudié dans ce cas provient de l'arrachement de l'électron du donneur par l'accepteur au travers de l'ADN, et non pas de l'injection de l'électron dans l'ADN jusqu'à l'accepteur. L'accepteur d'électron (ou encore l'oxydant) utilisé est la 2-aminopurine (Ap, voir **Figure 9**). C'est une base synthétique fluorescente analogue de l'adénine, qui s'intègre parfaitement dans l'ADN sans modifier la double hélice (O'Neill et Barton. 2004b). Ap devient oxydante lorsqu'elle est photoexcitée à 335 nm. Elle fluoresce entre 355 et 525 nm si elle ne peut arracher un électron à son milieu. Son potentiel de réduction de 1.5 V ne lui permet d'oxyder que la guanine (potentiel d'oxydation de 1.3 V) parmi les quatre bases de l'ADN. Ap est incorporée dans des duplexes d'ADN de 14 bases de long, qui ne contiennent qu'une seule guanine. Dans l'ADN, la fluorescence rend compte du temps et de l'efficacité qu'un électron, venant de la guanine, met pour atteindre Ap. Lorsque Ap et G sont sur le même brin, il y a une dépendance forte du transfert de charge sur la distance entre Ap et G, variant de 1 à 4 bases, mais le transfert est rapide. Par contre, lorsque Ap et G sont sur chacun des deux brins complémentaires, le taux de transfert de charge est faible et sa vitesse est divisée

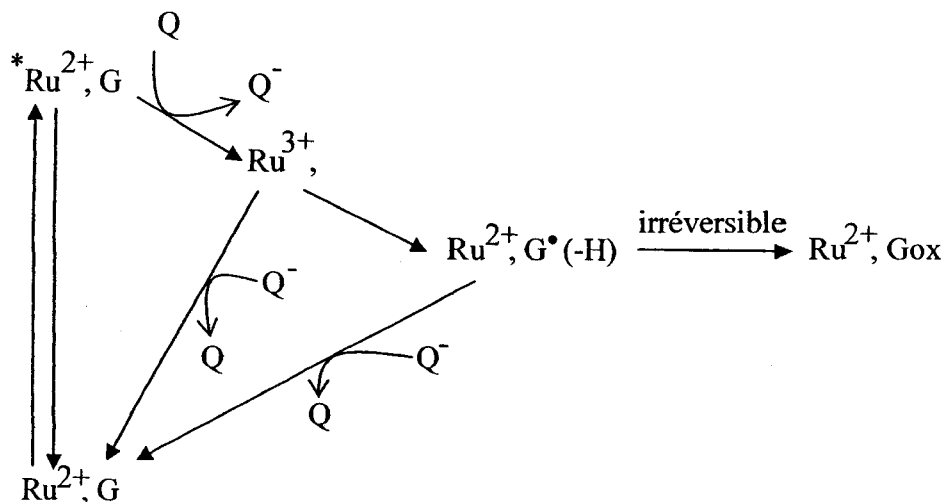


par mille. Étant donné que les empilements  $\pi$  de chacun des brins ne se chevauchent pas, mais sont simplement liés par les liaisons hydrogènes, la perte d'efficacité du transfert de charge est expliquée par la nécessité qu'a l'électron de franchir les empilements pour quitter G et atteindre Ap (Wan et al. 2000). Ceci est confirmé par l'étude du transfert de charge dans un duplexe hybride ADN : ARN (O'Neill et Barton. 2002). Ce duplexe particulier présente une structure proche de l'ADN A, dans lequel les bases des deux brins sont empilées en alternance, et entremêlent l'empilement  $\pi$  des deux brins. La perte d'efficacité de transfert entre brins est absente dans cette structure. Ces résultats soulignent à nouveau le rôle de l'empilement  $\pi$  dans le transfert de charge.

#### **I-3.1.2.2 Détection du radical neutre de la guanine après transfert de charge dans l'ADN**

Le même complexe métallique de Ru(II), le  $\text{Ru(phen)}_2\text{dppz}^{2+}$ , utilisé précédemment comme donneur d'électron peut être utilisé à l'inverse pour ses propriétés oxydantes dans l'ADN. (L'emploi de Ru(II) comme agent photooxydant est moins aisé que l'emploi de Rh(III) mais fournit par contre des résultats spectrométriques plus clairs (O'Neill et Barton. 2004b). Par la suite Rh(III) sera l'agent oxydant choisi pour les études de clivage de brin par transfert de charge dans l'ADN). En présence d'un accepteur d'électron non-intercalé Q (**Figure 10**), le complexe de Ru(II) photoexcité ( $\text{Ru(II)}^*$ ) devient Ru(III) et peut à son tour arracher un électron à l'ADN. Le potentiel d'oxydation de Ru(III) de 1.4 V ne lui permet d'oxyder que la guanine. Le complexe de Ru(II) est intercalé dans un ADN poly(dG-dC) et par la technique de flash-quench (Stemp et al. 1997) le spectre UV-visible du radical neutre de G (structure **40 Figure 7**) est détecté.

L'identité du radical est déduite par analogie avec le spectre obtenu par radiolyse pulsée de la guanine (Candeias et Steenken. 1989). La technique de flash-quench permet de préciser que 200 nanosecondes sont nécessaires à la formation du radical neutre de G dans l'ADN, ce qui inclut les étapes de transfert de charge et de déprotonation.



**Figure 10 : méthodologie de flash-quench avec le complexe métallique de Ruthénium. Q représente  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ , G représente la guanine. D'après (Stemp et al. 1997).**

### I-3.1.2.3 Transfert de charge à longue distance par étude du clivage aux doublets de G

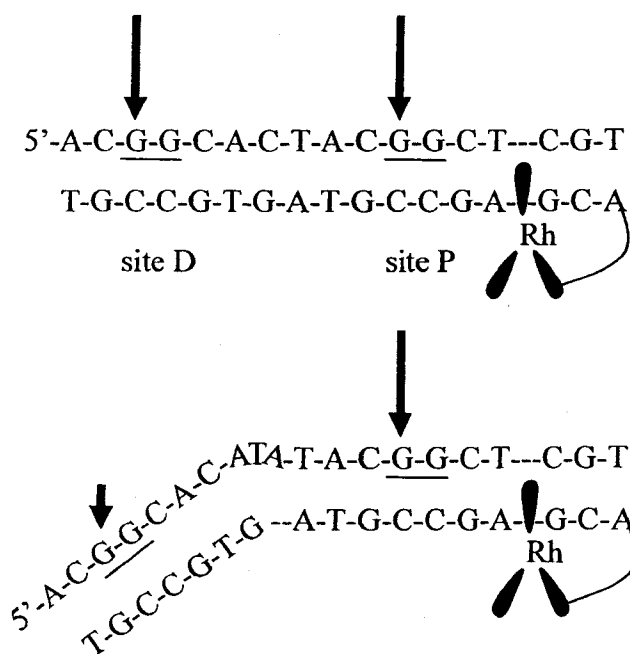
Comme discuté précédemment, G est la base la plus facilement oxydable de l'ADN. Lorsque deux ou trois G sont consécutives sur un brin d'ADN leur propension à s'oxyder est augmentée par rapport à une seul G. Pour cette raison des doublets et triplets de G sont disposés sur les séquences où le transfert de charge est étudié. Quand elle est induite

par un transfert de charge uniquement et non pas par l'attaque du radical OH, l'oxydation des deux guanines voisines, appelées sites GG, se fait préférentiellement sur la guanine en 5' comparativement à la guanine en 3', dans des proportions d'environ 3 pour 1. Dans le cas d'un site composé de trois G, la base centrale est la plus oxydable. La formation de ces types de dommages asymétrique sur les doublets de G et central sur les triplets est la signature du transfert de charge dans l'ADN. L'orientation de l'oxydation du côté 5' du doublet GG est attribuée à la mise en commun des orbitales des GG, qui sont déplacées du côté 5'. La réactivité des séquences contenant des G suit l'ordre de leur potentiel d'oxydation calculé : 5'-GGG > 5'-GG > 5'-GA >> 5'GC, -5'GT (Saito et al. 1995).

L'efficacité de transfert de charge dans l'ADN est mesurée ici entre deux sites GG, après analyse d'un gel d'électrophorèse (voir annexe). Le site le plus proche du photosensibilisateur est appelé site proximal (P), et le site le plus loin est le site distal (D). Le ratio de l'intensité de clivage distal sur proximal (ratio D/P) indique l'efficacité du TC.

Du transfert de charge à longue distance dans l'ADN double brin a été effectué au moyen des photooxydants métalliques Ru(II) et Rh(III) (Holmlin et al. 1997). Rh(III) possède un potentiel d'oxydation de 2 V et peut en théorie oxyder les quatre bases (O'Neill et Barton. 2004b). En utilisant un oligonucléotide de 17 bases qui comprend un complexe Rh(III) lié et intercalé et qui contient deux sites doublets de G séparés de 6 bases (5'-CACTAC-3', **Figure 11**), il est montré que l'oxydation aux GG, générée après photolyse du duplexe à 365 nm, est 1) exclusive au 5'G des deux sites GG, et 2) égale sur chacun des 5'G (Hall et al. 1996). En utilisant un complexe métallique de Rh(III) qui s'intercale beaucoup moins bien dans l'empilement  $\pi$ , la coupure induite par le traitement à la pipéridine, au

niveau des doublet de G, est diminuée. De façon similaire, l'introduction d'une structure en bulle (trois bases surnuméraires qui ne peuvent s'intercaler) entre les sites GG provoque la diminution du clivage au site GG distal (**Figure 11**). Ceci confirme par une méthode chimique et non pas spectroscopique qu'un transfert de charge s'opère, ne diminue pas avec la distance étudiée mais est sensible à l'empilement des bases d'ADN et à l'alignement de l'oxydant avec celles-ci.



**Figure 11:** conséquence sur le transfert de charge de la rupture de l'empilement  $\pi$ .  
La longueur des flèches représente l'intensité de clivage aux sites GG. D'après  
(Holmlin et al. 1997).

#### **I-3.1.2.4 Influence des séquences rigides sur le transfert de charge et rôle de la polarisation de l'ADN**

L'effet, sur le transfert de charge entre deux sites GG, de longues séquences de T (de 4 à 10 T) ou de longues séquences de A (de 4 à 10 A) ou de longues séquences mixtes TA (de 2 à 5 TA) est étudié dans des oligonucléotides liés à un complexe de Rh(III) (Williams et al. 2000). Lorsque deux sites GG sont séparés par 4 T, le ratio clivage distal/proximal est égal à 1, comme vu précédemment pour une séquence mixte de 6 bases. De façon surprenante, l'augmentation du nombre de T jusqu'à 8 entre les GG n'affecte pas le transfert aux GG distaux, et provoque même une oxydation plus grande sur le GG distal que sur le proximal, telle qu'indiquée par la valeur de 2.2 pour le ratio de clivage distal/proximal. Les résultats de l'augmentation de l'espacement des deux sites GG par les séquences répétitives de A et TA vont dans le même sens. Par contre, l'insertion de 5'-CG-3' au milieu d'une séquence de TA diminue l'intensité de clivage sur le GG distant. Les longues séquences de TA, A et T employées ici pour séparer les sites GG présentent un empilement  $\pi$  particulièrement linéaire (O'Neill et Barton. 2004b) et stable, qui n'est pas caractéristique de la structure B canonique de l'ADN, et qui rend visiblement le transfert d'électron efficace vers le site GG distal.

Cette série d'expériences est reprise plus tard, selon le même protocole, afin de déterminer si une polarisation des brins d'ADN est à l'origine de l'oxydation préférentielle souvent observée au GG distal (Williams et Barton. 2002). Les complexes métalliques de Ru, Rh, de même que l'éthidium sont tous des cations. Les extrémités d'ADN où ils sont liés est donc chargé plus positivement que les extrémités opposées. En introduisant une charge négative proche du complexe de Rh, par l'intermédiaire d'un groupement phosphate, la charge résultante locale avoisinant l'oxydant est diminuée.

Très clairement, la diminution de cette charge a pour conséquence de rééquilibrer le taux de clivage entre le GG distal et le proximal, qui diminue tout en restant supérieur à 1. Ceci montre la sensibilité du transfert de charge à la polarisation électrique de l'ADN. L'effet proposé de la charge peut être soit d'aider l'injection du trou d'électron, soit d'entraîner une hausse du potentiel d'oxydation du site GG proximal, le rendant moins facilement oxydable. Ces dernières expériences ne remettent en cause ni l'effet conducteur des séquences rigides poly A, poly T ou poly TA, ni l'effet négatif de l'insertion de CG dans ces séquences (Williams et Barton. 2002).

### I-3.1.2.5 Ionisation des bases séparant l'oxydant et le site final d'oxydation

L'oxydation de G à distance par Ap a suggéré que l'oxydant et l'oxydé sont couplés grâce à l'ADN, sans que les bases les séparant perdent momentanément un électron. Récemment, dans le but de vérifier si le pont d'ADN (c'est-à-dire les bases qui séparent le donneur et l'accepteur d'électron) peut être ionisé ou non lors du transfert de charge, deux bases modifiées sont insérées dans des oligonucléotides incorporant un complexe de Rh(III). Ces bases, qui sont la  $N_4$ -cyclopropylcytosine ( $^{CP}C$ ) et la  $N_2$ -cyclopropylamine-guanine ( $^{CP}G$ ), sont considérées comme étant des pièges rapides à trou d'électron (Nakatani et al. 2001). Ces bases sont constituées par l'alkylation de l'amine exocyclique des bases cytosine et guanine, respectivement, par un groupement cyclopropyle (**Figure 9**). Les potentiels d'oxydation de ces bases modifiées sont semblables à ceux de C et G respectivement, et surtout dans le même sens que celui des bases naturelles, c'est à dire que celui de  $^{CP}C$  est supérieur à celui de  $^{CP}G$ . Lorsque le radical cation de ces bases modifiées est formé, il est consommé par l'ouverture rapide

( $10^{-11}$  s) et irréversible du cyclopropyle (Shao et al. 2005). Après photolyse des duplexes contenant Rh(III) et un site GG séparés par  $^{CP}C$ , la détection par HPLC du produit d'ouverture de  $^{CP}C$  montre qu'un radical cation a été formé sur cette base. Il en est déduit que, dans le cas de l'oxydation d'ADN par Rh(III), le pont d'ADN est traversé par les radicaux cations des bases séparant l'oxydant et les GG (Shao et al. 2004). Malgré la différence de potentiel d'oxydation entre C et G, l'ouverture de  $^{CP}G$ , placé dans le même environnement chimique que  $^{CP}C$  (c'est-à-dire entouré de la même séquence) est mesurée avec les mêmes rendements que l'ouverture de  $^{CP}C$ . Ceci suggère que la séquence d'ADN a annulé la différence de potentiel d'oxydation.

### ***I-3.1.3 Théorie du transfert de charges dans l'ADN par saut au travers des domaines d'ADN aligné***

Il est difficile de réunir tous les résultats des expériences de l'équipe de J.K.Barton dans une seule et même théorie de transfert de charge. Principalement, le mécanisme régissant le transfert de charge entre Ap et G n'est pas compatible avec le mécanisme qui comprend l'ionisation du pont entre le donneur et l'accepteur. Le transfert de charge qui s'opère entre Ap et G a les caractéristiques d'un superéchange (Lewis et Wasielewski. 2004). Celui-ci est lié à une forte dépendance sur la distance qui permet un transfert de charge difficile sur plus de 10 Å.

Les intercalants de Rh(III) sont capables d'oxyder les quatre bases à longue distance. Pour récapituler, ils provoquent l'injection d'un radical cation sur l'ADN, puis un transfert de charge qui est peu dépendant du potentiel d'oxydation du pont d'ADN.

Puisque l'empilement  $\pi$  qui existe dans l'ADN et qui met en contact les orbitales des bases de l'ADN joue un rôle dans le transfert de charge, et que le taux de clivage aux GG distants est égal ou supérieur à celui des GG proximaux, il est proposé que la charge (le trou d'électron) se délocalise largement dans l'ADN. Ensuite, la charge se stabilise sur les zones de l'ADN qui sont les plus facilement oxydables, c'est-à-dire les sites GG. La charge ne se délocalise pas sur toute la séquence d'ADN, puisqu'il est impossible, à cause des mouvements des bases de l'ADN en solution, que l'empilement de l'ADN soit continu au cours du temps. Barton introduit le concept de domaine d'ADN (O'Neill et Barton. 2004a) pour décrire une séquence d'ADN où les bases restent en permanence alignées dans l'empilement  $\pi$ . Un domaine mesure de 3 à 5 bases de long et est intrinsèque à l'ADN : il est présent avant que la charge y soit injectée. Lorsque à un moment donné tous les domaines d'une même séquence sont alignés, le transfert de charge peut s'opérer d'un bout à l'autre de la séquence.



### **I-3.2 Transfert de charges par saut du polaron**

Cette théorie de transfert de charge dans l'ADN a été proposée par l'équipe de G. Schuster, qui utilise l'anthraquinone (AQ) comme photosensibilisateur, liée à l'ADN de façon covalente (**Figure 12**). L'utilisation de l'anthraquinone pour étudier le transfert de charge à longue distance dans l'ADN provient originellement de travaux visant à étudier les propriétés de photoclivage de l'ADN qu'ont plusieurs composés possédant un noyau d'anthraquinone (Armitage et al. 1994; Breslin et Schuster. 1996). Ces composés, sous forme libre en solution, s'intercalent dans la double hélice d'ADN, sans préférence de séquence, et génèrent deux types de dommages à l'ADN après illumination dans le domaine des UVA. Le premier type de dommage est une cassure franche d'un des brins d'ADN, et ceci est attribué à l'arrachement local d'un proton sur un sucre par les noyaux AQ. Le dommage au sucre est situé au niveau d'un site d'intercalation de AQ. Le second type de dommage est l'oxydation des doublets de G, révélant qu'il y a eu un transfert de charge (voir plus haut). Étant donné que le radical anion de AQ est détecté pendant la photolyse, cette expérience établit la propriété de AQ d'induire du transfert de charge oxydatif dans l'ADN (Armitage et al. 1994).

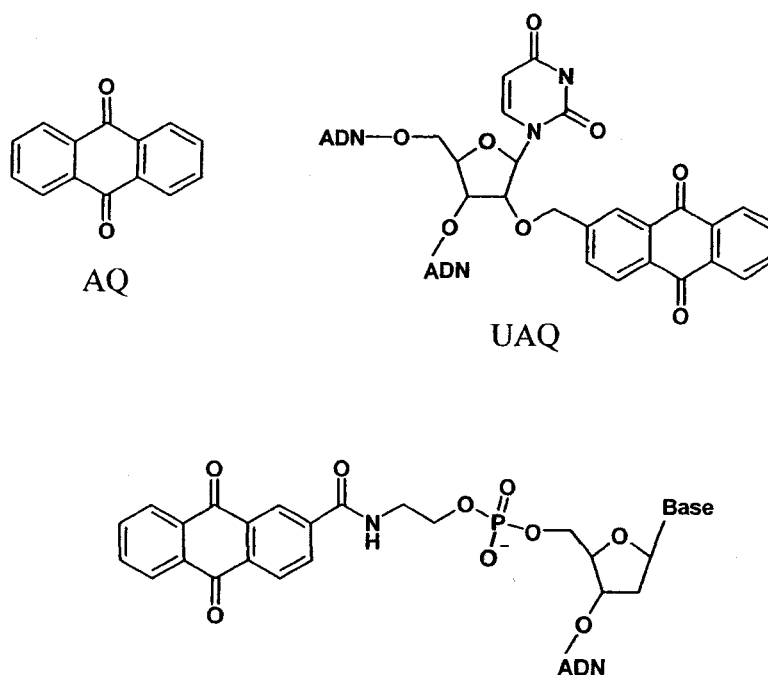
#### ***I-3.2.1 Méthodologie d'étude du transfert de charge induit par***

##### ***l'anthraquinone :***

###### **I-3.2.1.1 Liaison de AQ à l'ADN**

Afin d'étudier l'effet de la distance de migration dans l'ADN soumis à un transfert de charge initié par AQ, le photosensibilisateur est lié de façon covalente à des

oligonucléotides synthétiques de séquence connue. AQ est liée au milieu des brins par l'intermédiaire d'un lien ester sur le C2' de l'uridine pour former le synthon UAQ (**Figure 12**). UAQ est obtenu par l'attaque de la bromométhylantraquinone par le sucre de l'uridine activé par le dibutyltétain (Ly et al. 1999). AQ peut être liée aussi en bout de chaîne d'ADN, du côté 5'. Dans ce cas le chlorure d'acyle d'AQ est préalablement mis à réagir avec le 2-aminoéthanol en présence de base, puis l'alcool linéaire résultant est converti en phosphoramidite (Gasper et Schuster. 1997). Ce dernier, tout comme UAQ, est incorporé à l'ADN pendant la synthèse automatique des oligonucléotides. Le 2-aminoéthanol sert d'espaceur entre AQ et l'ADN et permet au photosensibilisateur de coiffer les deux brins d'ADN à leur extrémité, sans intercalation qui perturberait l'empilement des bases.



**Figure 12 : l'anthraquinone (AQ) et ses modes de liaison à l'ADN**

### **I-3.2.1.2 Variation des séquences et des distances de TC dans ADN-AQ**

L'ADN lié à AQ est choisi pour avoir une séquence riche en guanines et/ou doublets de G, avec parfois une ou plusieurs 8-oxodGuo. Selon les expériences, le brin qui porte AQ peut être le même qui porte les G, ou son complémentaire. C'est sur le brin riche en G, marqué enzymatiquement au  $^{32}\text{P}$ , que les dommages oxydatifs vont être visualisés et quantifiés. Les brins d'ADN incorporant AQ sont mis à hybrider avec leurs complémentaires, et en solution tamponnée à pH 7.0, les duplexes d'ADN sont photolysés avec une source UV émettant à 365 nm. À cette longueur d'onde seule AQ absorbe et aucun dommage à l'ADN n'est réalisé par effet direct (Schuster et Landman, 2004).

#### **I-3.2.1.2.a Transfert de charge dans une séquence hétérogène**

La séquence 1 (**Figure 13**) est une séquence dite hétérogène, qui est composée d'un mélange des quatre bases, comme l'ADN naturel. Cette séquence de 70 bases contient quatre sites GG inégalement espacés, et qui sont séparés d'au moins 9 bases. La photolyse du duplexe contenant la séquence 1 montre une relation linéaire entre le logarithme de l'intensité d'oxydation aux GG et la distance de migration. En d'autres termes, l'efficacité du transfert diminue progressivement et régulièrement avec la distance, mais sans être influencée par la séquence (Henderson et al. 1999). Ce résultat surprend les expérimentateurs, qui s'attendaient à ce que le transfert varie selon les zones de l'ADN, qui sont supposées avoir des potentiels d'oxydation différents selon les bases qui les composent. Puisque chaque base prise séparément a un potentiel propre (Steenken et Jovanovic. 1997), il existe donc un phénomène de moyenne des potentiels d'oxydation dans l'ADN, qui suggère une mise en commun des orbitales des bases (Henderson et al.

1999; Schuster et Landman. 2004). Cette mise en commun des orbitales, à un niveau très local, avait déjà été remarquée dans les sites GG (voir plus haut).

Séquence 1

5'-TACGTGGCTTTTCGGTCACTGCATTAGTTAAAGGAATGTGCGCTGACC  
AAGGAACCAAAC-3'-AQ

Résultat : le logarithme de l'intensité du clivage diminue linéairement avec la distance.

Séquence 2

AQ-5'-AAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAAA-3'

Résultat : le clivage est de même intensité sur tous les sites GG.

Séquence 3

5'-GCGTGGTACCACGGCACCTTTA-AQ-ATTTCCACGGCACCATGGTGGC-3'  
3'-CGCACCATGGTGGCCGTGGAAAT G TAAAG8TGCCGTGGTACCACGC-5'

Résultat : la taille du polaron est de moins de 5 bases (voir texte).

Séquences 4 et 5

5'-AAAT8GTGTGTGTGTGGTAAATT-3'-AQ

5'-AAAT8GTGTGTTTGTGTGGTAAATT-3'-AQ

Résultat : les quatre T ajoutés (en italique) sur la séquence 5 bloquent le transfert.

**Figure 13 : quelques séquences utilisées par l'équipe de G.B. Schuster.**

**Toutes sont en double brin même lorsqu'un seul brin est représenté. Le clivage est observé sur les bases soulignées.**

**I-3.2.1.2.b Effet de la distance entre doublets de guanines**

L'étude du transfert de charge dans des duplexes contenant des doublets de G plus rapprochés amène des résultats différents. Le transfert de charges dans les séquences où les GG sont séparées par 1 à 3 adénines (séquence 2) diminue très peu avec la distance,

ce qui est montré par le clivage quasiment égal des GG tout le long de la séquence (Liu et al. 2004). La perte d'efficacité de migration par base parcourue est 10 fois plus faible que dans la séquence homogène précédente. Un résultat similaire est obtenu dans les séquences où les GG sont séparés par 1 à 3 T, même si dans ce cas la dépendance sur la distance est un peu plus forte

Par contre, lorsque les GG sont séparés par 4 A ou plus, ou 4 T ou plus ou 4 bases ou plus qui sont un mélange de A ou T (séquence non représentée), la dépendance du transfert de charge sur la distance augmente, ce qui revient à dire que le transfert de charge diminue plus vite avec la distance. Cependant le logarithme de la dépendance sur la distance reste linéaire. L'espacement de plus de trois bases des sites facilement oxydables que sont les doublets de G provoque donc un changement de l'efficacité de migration des radicaux. Ce changement d'efficacité montre que le transport de charge dans l'ADN lié à AQ, pour être efficace sur une longue distance, dépend de la présence régulière des guanines sur la séquence.

### ***I-3.2.2 Théorie du transfert de charge par saut du polaron***

#### **I-3.2.2.1 Le polaron : définition**

L'existence d'un phénomène de moyenne des potentiels d'oxydation des bases dans l'ADN a conduit l'équipe de Schuster à proposer que la charge (le trou d'électron) est délocalisée sur quelques bases dans l'ADN. Dans ce cas, la charge délocalisée serait centrée sur une guanine, ou sur un doublet de G, parce que ces sites sont des sites de bas potentiel d'oxydation. Cette charge délocalisée est appelée un polaron, en référence aux charges délocalisées existant dans les polymères (Schuster et Landman. 2004). Le

polaron n'existe pas dans l'ADN natif, il est une conséquence de la création de la charge (Henderson et al. 1999; Schuster. 2000). Étant donné que le radical cation créé dans l'ADN par l'oxydation est une structure déficiente en électron, il est attendu que ce manque d'électron va être compensé par les bases voisines, dont les orbitales atomiques communiquent localement avec la base ionisée. La délocalisation de la charge sur quelques bases stabilise le déficit d'électron, ce qui fait diminuer l'énergie du système. Ainsi, le polaron est une structure auto-stabilisée et énergétiquement favorable découlant de l'ionisation. Une conséquence anticipée du polaron est la déformation locale de l'ADN, par le rapprochement des bases entourant le centre du polaron. Le polaron ne peut pas être long car l'énergie gagnée par sa stabilisation serait perdue par une déformation longue de l'ADN.

### **I-3.2.2.2 Arguments en faveur du polaron**

#### **I-3.2.2.2.a La glissade du polaron est peu coûteuse en énergie**

À l'état de monomères, les potentiels d'oxydation des nucléosides ont été mesurés. Dans l'ADN, par contre, une telle mesure n'est pas possible. La mise en commun des orbitales moléculaires des bases dans les doublets de G, l'effet de moyenne observé dans l'efficacité de transfert de charge dans un ADN inhomogène (voir plus haut), ou l'importance de l'empilement  $\pi$  dans le transfert de charge font penser que les potentiels d'oxydation des quatre bases dans l'ADN sont très proches, et varient selon l'environnement chimique (les bases voisines de la base concernée). Par calcul, l'équipe de Saito (Nakatani et al. 2000) a montré que les potentiels d'oxydation de diverses séquences centrées sur des G sont semblables. À titre d'exemple, voir la **Figure 14**.

Conséquemment, le polaron peut glisser sur la séquence illustrée sans avoir à franchir une barrière d'énergie importante.

| Séquence     | Potentiel d'oxydation<br>calculé (eV) |
|--------------|---------------------------------------|
| CGC          | 6.96                                  |
| <u>TTGTT</u> | 6.96                                  |
| AGC          | 7.01                                  |
| <i>TAGTT</i> | 6.93                                  |

CGCTTGTTAGC*TAGTT*TTGTT

**Figure 14: potentiels d'oxydation calculés pour des courtes séquences d'ADN.**

#### **I-3.2.2.2.b L'énergie requise pour la glissade du polaron est apportée par les mouvements du polymère d'ADN**

L'ADN est en perpétuel mouvement en solution, avec des déformations de structure qui durent entre quelques picosecondes et quelques millisecondes (O'Neill et Barton. 2004b), et qui sont régies par des fluctuations thermiques. Encore une fois par calcul, Schuster a montré que le déplacement des contre-ions  $\text{Na}^+$  dans l'ADN induit une variation locale des potentiels d'oxydation (Barnett et al. 2001). Il en est déduit que cette variation peut servir de moteur pour le polaron, et l'amener à se déplacer au gré des déformations de l'ADN.

#### **I-3.2.2.2.c Participation des adénines au transfert de charge**

L'existence du polaron implique qu'il y ait ionisation du pont d'ADN entre les sites d'oxydation favorables que sont les guanines. De plus, si la charge est délocalisée

sur plusieurs bases autour de G, cela implique que cette charge existe physiquement aussi sur A, T ou C, même si cela n'est que momentané. <sup>CP</sup>A fonctionne selon le même principe que <sup>CP</sup>G et <sup>CP</sup>C. Dans un oligonucléotide lié à AQ de la façon utilisée par l'équipe de Schuster, <sup>CP</sup>A est insérée entre quatre T séparant deux doublets de G, comme suit : 5'-GG-TT-<sup>CP</sup>A-TT-GG-3' (les séquences continuent de part et d'autre). Après photolyse du duplexe d'ADN, la détection du produit d'ouverture de <sup>CP</sup>A indique la participation du radical d'adénine au transfert de charge. Ce résultat est considéré comme un appui à l'existence du polaron (Schuster et Landman. 2004).

### I-3.2.2.2.d Taille du polaron

La taille du polaron est variable d'une séquence à l'autre. Dans la séquence 3 (Ly et al. 1999), AQ est en position centrale sur le brin, qui contient un doublet de G en 3' de AQ séparé par 8 bases, et une 8-oxodGuo du côté 3' de AQ séparée de 5 bases. Étant donné qu'un clivage efficace est observé sur le site GG, il est estimé que les orbitales électroniques de AQ et 8-oxodGuo ne sont pas couplées à l'intérieur d'un polaron, sinon la présence de la 8-oxodGuo, qui est une trappe plus profonde que le site GG, orienterait le transfert majoritairement du côté 3' de AQ, ce qui n'est pas observé. Il en est déduit que la taille du polaron dans cette séquence ne dépasse pas 5 bases.

Une autre expérience permet d'avoir une idée de la taille d'un polaron : dans les séquences 4 et 5, composées de l'alternance de G et T, le transfert induit par AQ est indépendant de la distance, du fait de la présence régulière de guanines (Joseph et Schuster. 2006). Après photolyse, les G sont toutes également oxydées le long du brin. L'insertion de quatre T consécutifs entre deux G au milieu de la séquence élimine l'oxydation des guanines qui sont séparées de AQ par les quatre T (séquence 5). La



séquence de quatre T est ici une barrière énergétique infranchissable par le polaron. Dans ce cas il est proposé que la taille du polaron est de moins de 5 bases, puisqu'il ne peut s'étendre sur les quatre T en incluant une guanine.

La perte d'efficacité de transfert de charge remarquée lorsque les G sont séparés de 4 bases ou plus est expliquée par l'hypothèse suivante (Liu et al. 2004) : pour se déplacer d'une guanine à une autre, le polaron doit s'étendre sur une taille plus longue, ce qui est plus coûteux en énergie, et par conséquent le transfert sur ces longues distances est moins favorable.

### ***I-3.2.2 Récapitulatif : étapes du transfert de charge dans l'ADN***

#### ***photosensibilisé lié à AQ***

La liaison covalente de AQ à l'ADN inhibe totalement la réaction d'arrachement de l'atome d'hydrogène sur les sucres. Par contre, AQ liée à l'ADN induit efficacement du transfert de charge à longue distance, jusqu'à 200 Å (60 bases), en arrachant un électron sur une base proche de son site de liaison à l'ADN (Henderson et al. 1999). Cette étape d'oxydation est appelée injection du radical dans l'ADN. L'injection est efficace lorsque AQ est éloignée de G/C par un à trois A ou T, car la proximité de G et AQ provoque la recombinaison des radicaux respectifs (Saniei et Schuster. 2000). En présence d'oxygène, la régénération oxydative de AQ par O<sub>2</sub> empêche l'annihilation du radical de AQ avec ceux de A ou T (Schuster. 2000), de la même façon que décrite pour MQ.

La seconde étape du transfert de charge dans l'ADN est la migration du radical cation, appelé aussi trou d'électron, formé à proximité de AQ, et qui s'éloigne de cette dernière sous la forme d'un polaron. La migration s'achève lorsque le polaron se stabilise et se recentre sur la séquence de telle manière que le radical cation de la guanine s'hydrate ou

se déprotonne. Cette étape, qui voit la disparition du radical et donc la fin du transfert, est le piégeage.

#### **I-4 Pontages interbrins dans l'ADN**

En plus d'induire du transfert de charge dans l'ADN, les quinones MQ et AQ provoquent la formation de pontages interbrins dans les oligonucléotides étudiés (voir les chapitres II, III, IV).

Les pontages interbrins de l'ADN sont parmi les dommages les plus toxiques dans les cellules (Dronkert et Kanaar. 2001; Noll et al. 2006; Scharer. 2005). Ils sont responsables de la mortalité cellulaire et de l'apparition de mutations. Dans le cas de cellules ne pouvant pas réparer ces dommages, un seul pontage suffit à induire un effet létal sur une bactérie ou une levure, tandis que de 20 à 40 pontages sont nécessaires pour induire la mort cellulaire chez les mammifères.

Les agents chimiques libres capables d'engendrer des pontages interbrins dans l'ADN sont des molécules bi-fonctionnelles, qui vont réaliser une alkylation sur chacun des brins d'ADN. Si la mono-alkylation de l'ADN est à elle seule une source de toxicité, la bis-alkylation locale de l'ADN sur chaque brin est beaucoup plus délétère, d'abord en rendant impossible la séparation des brins d'ADN, ce qui en inhibe leurs fonctions, et ensuite en provoquant des cassures de brin d'ADN lors des tentatives de réparation. Les systèmes de réparation cellulaire REB (réparation par excision de base) et REN (réparation par excision de nucléotide) s'appuient tous deux sur l'emploi d'un brin d'ADN intact comme matrice pour reconstruire le brin endommagé. Dans le cas de la réparation des pontages interbrins, l'absence d'un brin intact conduit à des cassures double brin qui apparaissent au niveau des chromosomes. Ceci se traduit entre autres par des échanges de chromatides soeurs et des pertes de segments de chromosomes.

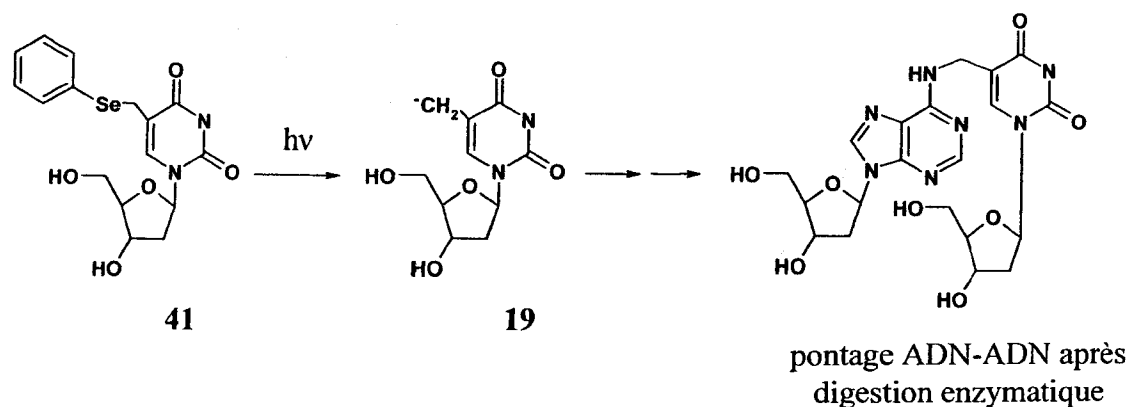
Les agents responsables de la formation de pontages interbrins dans l'ADN peuvent être d'origine endogène. Ils dérivent principalement de la peroxydation lipidique ou de l'oxydation de sucres et présentent une structure linéaire. Pour l'instant, les pontages interbrins induits par ces agents endogènes ont été provoqués *in vitro* et ne sont pas détectés dans des échantillons biologiques. La faculté qu'ont les agents pontants de l'ADN à tuer les cellules en fait des agents thérapeutiques efficaces contre le cancer et contre d'autres maladies. L'intérêt d'étudier les propriétés de divers agents pontants de l'ADN est donc double : mettre au point des agents dimérisants thérapeutiques, et comprendre les mécanismes cellulaires de réparation, notamment pour concevoir des agents thérapeutiques induisant des dommages difficiles à réparer, et qui ne conduisent pas à une résistance cellulaire.

Comme les adduits reliant les deux brins d'ADN comptent pour seulement 1 à 5% de tous les adduits formés par les agents alkylants bifonctionnels, des stratégies ont été mises au point afin d'obtenir les pontages interbrins de manière plus spécifique et avec des rendements accrus. Plusieurs stratégies basées sur des synthèses chimiques seront décrites ultérieurement, après une présentation de divers pontages interbrins photoinduits et chimioinduits.

### **I-4.1 Pontages interbrins photoinduits ADN-ADN**

Le précurseur du pontage décrit par Greenberg et al. est un groupement phenyl sélénide porté par le méthyle de Thd (**Figure 15**). Après illumination à 350 nm, le clivage homolytique de la liaison C-Se fournit le radical 5-(2'-desoxyuridinyle) méthyle **19**, le

même qui est obtenu par oxydation à un électron ou radiolyse de Thd. La formation du radical peut aussi être déclenchée thermiquement. Le précurseur **41** est inséré dans un

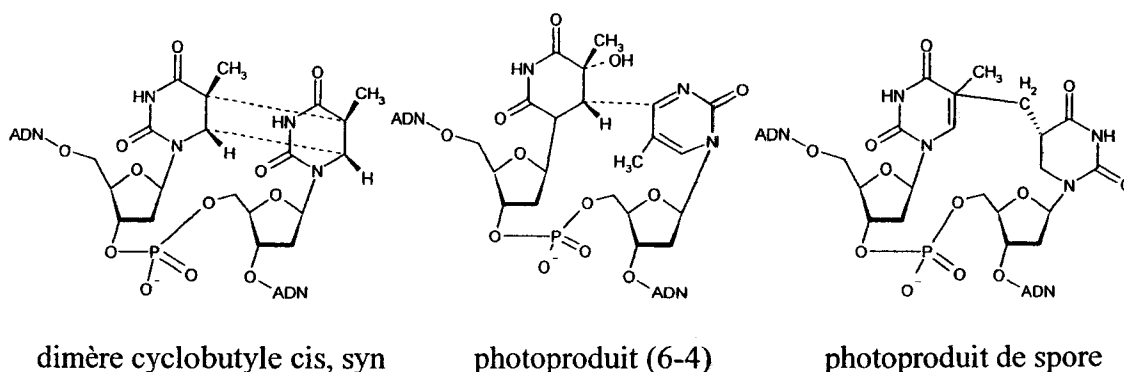


**Figure 15 : précurseur, radical et pontage décrits par Greenberg et al (Hong et al. 2005).**

oligonucléotide selon les méthodes habituelles, par l'intermédiaire de son équivalent tritylé en 5', et portant un phosphoramidite en 3'. L'attaque du radical 1 dans l'ADN sur une base voisine conduit à la formation d'une lésion tandem (Bellon et al. 2002; Romieu et al. 2000). Dans un oligonucléotide double brin le pontage se fait par attaque du radical de Thd sur l'azote N1 ou N6 de l'adénine avec laquelle **41** est apparié. Contrairement aux pontages déclenchés par une molécule exogène à l'ADN, ce pontage ne fait intervenir que la molécule d'ADN, sans la présence de l'agent inducteur du pontage.

La formation photoinduite de dimères interbrins est aussi rapportée dans un ADN double brin (Douki et al. 2003). Cependant, pour que la formation des dimères interbrins soit efficace, l'ADN doit être photolysé en conformation A, à l'état sec ou bien dans un

mélange eau/éthanol. La photolyse est effectuée par le rayonnement UVC, dans les longueurs d'ondes de lumière absorbée par l'ADN. Les produits formés par cette irradiation proviennent donc de l'effet direct des photons sur l'ADN. Après irradiation et



**Figure 16: pontages détectés dans l'ADN-A (d'après (Douki et al. 2003)).**

digestion enzymatique de l'ADN, les photoproduits de pontages inter et intrabrin des T sont détectés par la méthode de CLHP couplée à la spectrométrie de masse. La formation de trois catégories de dimères est quantifiée : les dimères cyclobutanes de Thd, les dimères de type spore de Thd, et les photoproduits (6-4) de dimères de Thd (**Figure 16**). Ces dimères peuvent être soit interbrins ou intrabrin, ce qui multiplie par deux le nombre de produits à différencier. Il faut distinguer ceux qui sont interbrins, c'est-à-dire reliant deux Thd provenant chacune d'un brin de l'ADN, et ceux qui sont des lésions tandems, reliant deux Thd voisines sur un même brin. La distinction du type inter ou intrabrin fait intervenir la stratégie suivante : les enzymes de digestion employées conduisent à la libération de dimères intrabrin en laissant entre les deux Thd le groupement phosphate qui relie les deux sucres, alors que lorsqu'un dimère interbrin est digéré, les phosphates liés aux deux Thd sont éliminés par ces mêmes enzymes. La détection des produits par

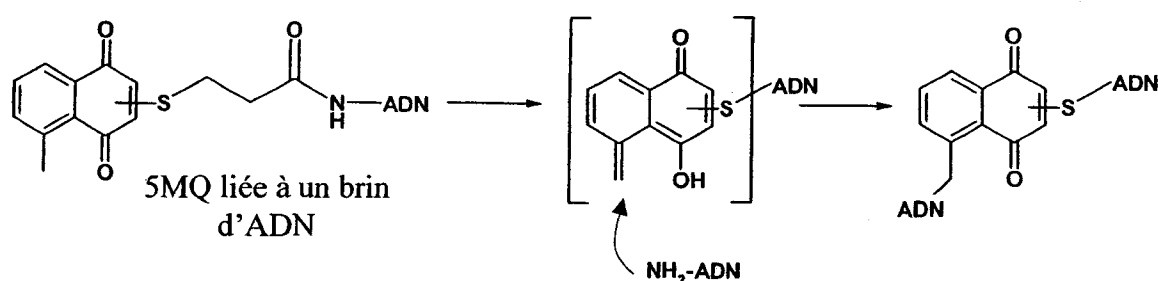
spectrométrie de masse permet ensuite de distinguer les dimères intrabrins contenant deux Thd et un phosphate des dimères interbrins contenant deux Thd sans phosphate. La formation des dimères interbrins est de l'ordre de quelques lésions par dix mille bases et pour dix mille Joules/m<sup>2</sup>. Le ratio de formation des dimères T<sup>T</sup> interbrin/intrabrin est de 1 : 9 dans l'ADN irradié dans eau/éthanol et de 1 : 3 dans l'ADN sec. Dans le cas de l'ADN sec irradié, l'augmentation du point de fusion de l'ADN est corrélée avec la formation des dimères interbrins. La nécessité d'avoir une structure d'ADN particulière pour induire des pontages interbrins ADN-ADN est discutée aussi dans le paragraphe suivant.

La propriété que présente le 5-bromouracile (BrU) d'induire des dimère interbrins dans l'ADN a été mise en évidence dans notre département, à la fois par irradiation  $\gamma$  (Cecchini et al. 2005a) et par photolyse dans l'UVC (Cecchini et al. 2005b). La formation des dimères a d'abord été observée dans des oligonucléotides 25-mères dans lesquels BrU a été inséré et nécessite que BrU soit localement dans une zone d'ADN mésappariée. Les deux brins d'oligonucléotides complémentaires ont des séquences qui s'apparient parfaitement sur les 10 bases entourant la zone centrale du duplexe, et à l'inverse la zone centrale est constituée des séquence 5'-A-A-BrU-A-A-3' en face de 5'-C-C-C-C-C-3', qui ne peuvent s'apparier. De cette façon les séquences périphériques servent de support à la zone centrale, appelée bulle, dans laquelle les bases de l'ADN adoptent une configuration beaucoup plus relâchée que dans l'ADN parfaitement hybridé, ou bien une configuration dans laquelle les bases sont intercalées au lieu de s'apparier. Le rendement maximum de formation de dimère est obtenu après photolyse de l'ADN à 280 nm. Le

radical uridin-5-yle est le responsable de l'attaque du brin complémentaire qui mène à la formation des dimères. Par photolyse, BrU donne le radical uridin-5-yle selon deux mécanismes possibles. Dans le premier, le clivage homolytique de la liaison C-Br génère directement l'uridin-5-yle alors que le second mécanisme implique un transfert de charge entre une adénine voisine de BrU, à laquelle BrU photoexcité arrache un électron pour former le radical cation de l'adénine et le radical anion de BrU. Ce dernier est converti en radical uridin-5-yle après libération de Br<sup>-</sup>. La pertinence de ce mécanisme est validée par la formation de dommages sur l'adénine en 5' de BrU. Par irradiation  $\gamma$  le même radical uridin-5-yle est obtenu, par addition d'un électron sur BrU pour donner le radical anion de BrU. La formation de dimère est empêchée lorsque la structure en bulle est remplacée par une séquence parfaitement complémentaire au brin contenant BrU. Dans cet ADN B normal, par contre, on détecte des cassures simples brins après radiolyse ou photolyse. Ceci révèle un changement de mécanisme d'action du radical uridin-5-yle, qui fait intervenir une réaction d'arrachement d'un atome de H sur les sucres. De façon inexploitée, il est possible, avec des rendements très faibles, de former par photolyse UV, un composé dimérique dans un oligonucléotide contenant une structure en bulle sans la présence de BrU. Cette formation n'est pas remarquée en absence de la structure en bulle, ce qui souligne de nouveau l'importance de cette structure particulière qu'est la bulle dans la formation de pontages ADN-ADN. De telles structures sont formées dans les cellules lors de la transcription de l'ADN et dans les fourches de réplication, ce qui stimule l'intérêt d'utiliser le BrU comme un photo ou radiosensibilisateur.



Un isomère de la ménadione, la 5-méthyl-1,4-naphthoquinone (5MQ), induit des pontages interbrins dans l'ADN lorsqu'il est préalablement lié sur un des brins (Chatterjee et Rokita. 1990). 5MQ porte un méthyle en position 5, et non pas en position 2 comme la ménadione. 5MQ a été lié à l'extrémité 5' d'un oligonucléotide, directement par le côté quinone de la molécule, au moyen d'une liaison C-S sur le C2 ou le C3 (**Figure 17**). Après photolyse du duplexe d'ADN à des longueurs d'ondes supérieures à

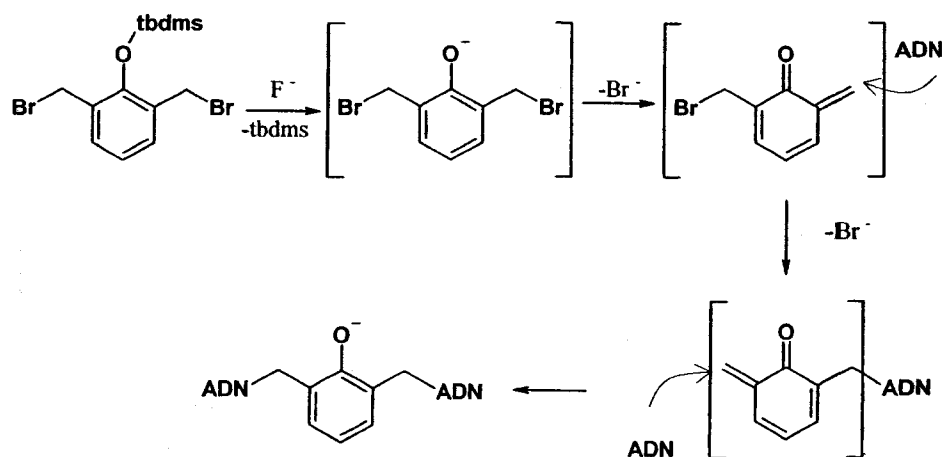


**Figure 17: pontages impliquant la 5MQ**

345 nm, ou bien après exposition au système réducteur Cytochrome C réductase/NADH (Chatterjee et Rokita. 1991), 5MQ forme un intermédiaire réduit hautement électrophile (Chatterjee et Rokita. 1994), un méthide de quinone (**Figure 17**). Ce méthide est attaqué facilement par les groupements amines exocycliques de C, G ou A portés par le brin complémentaire à celui qui contient 5MQ, ce qui conduit à la formation d'une liaison covalente responsable du pontage interbrin. L'alkylation du méthide de quinone entraîne la réoxydation du noyau de quinone. Les pontages dans l'ADN dans lesquels est inséré 5MQ se forment avec des rendements de 12 à 27% selon les duplexes. Lorsque l'isomère MQ remplace 5MQ le rendement de formation des pontages est diminué par un facteur quatre.

### I-4.2 Pontage interbrins chimioinduits

La réactivité des méthides de quinone a été ensuite utilisée par ce même groupe pour mettre au point un agent bis-alkylant de l'ADN, capable d'induire des pontages à l'état libre en solution (Zeng et Rokita. 1996). L'incubation de O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2,6-bis(bromométhyl)phénol (**Figure 18**) en présence de duplexes



**Figure 18: mécanisme de bisalkylation par les méthides de quinone**  
(d'après (Zeng et Rokita. 1996))

d'ADN courts (15 paires de bases) permet la formation de pontages d'ADN avec des rendements variant entre 2 et 7% selon la séquence. La présence en solution d'ions fluorure est absolument requise. Ceux-ci permettent la déprotection de l'alcool phénolique par le départ de la protection TBDMS. Ensuite la conversion de l'alcoolate en cétone provoque la formation du premier méthide par élimination du brome sous forme

de bromure. L'attaque nucléophile de l'ADN sur ce même méthide mène à la première alkylation et à la formation du second méthide, qui est à son tour alkylé par le brin d'ADN complémentaire. Les rendements de pontages peuvent paraître faibles mais sont comparables à ceux obtenus avec l'agent antitumeur mitomycine.

### I-4.3 Stratégies de formation de pontages ADN-ADN

#### I-4.3.1 Synthèse d'un pontage ADN-psoralène-ADN

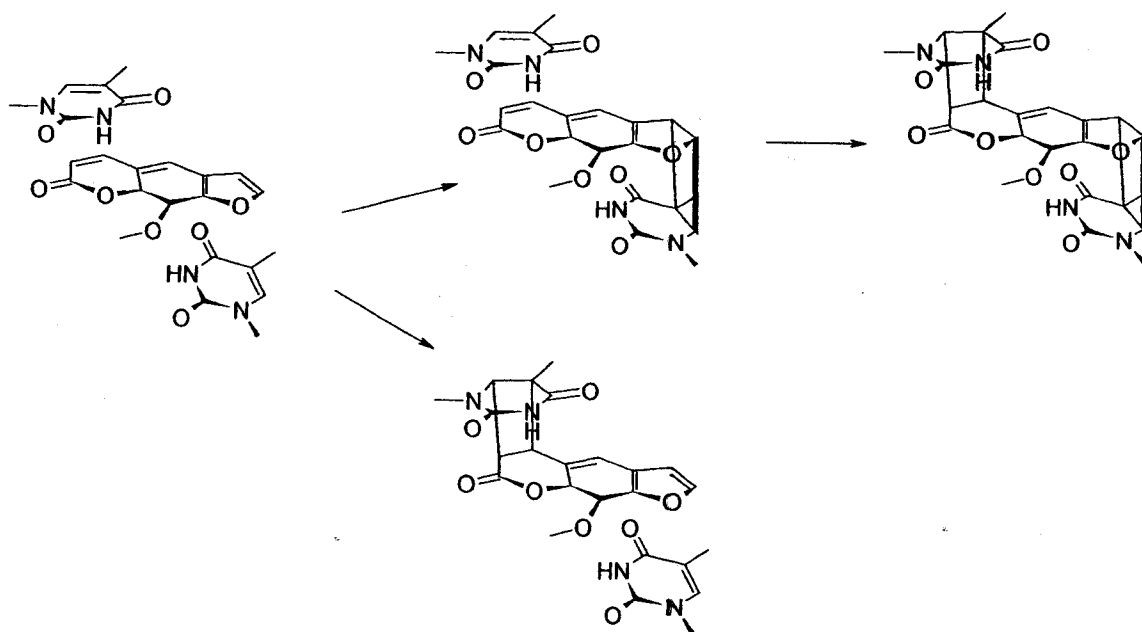


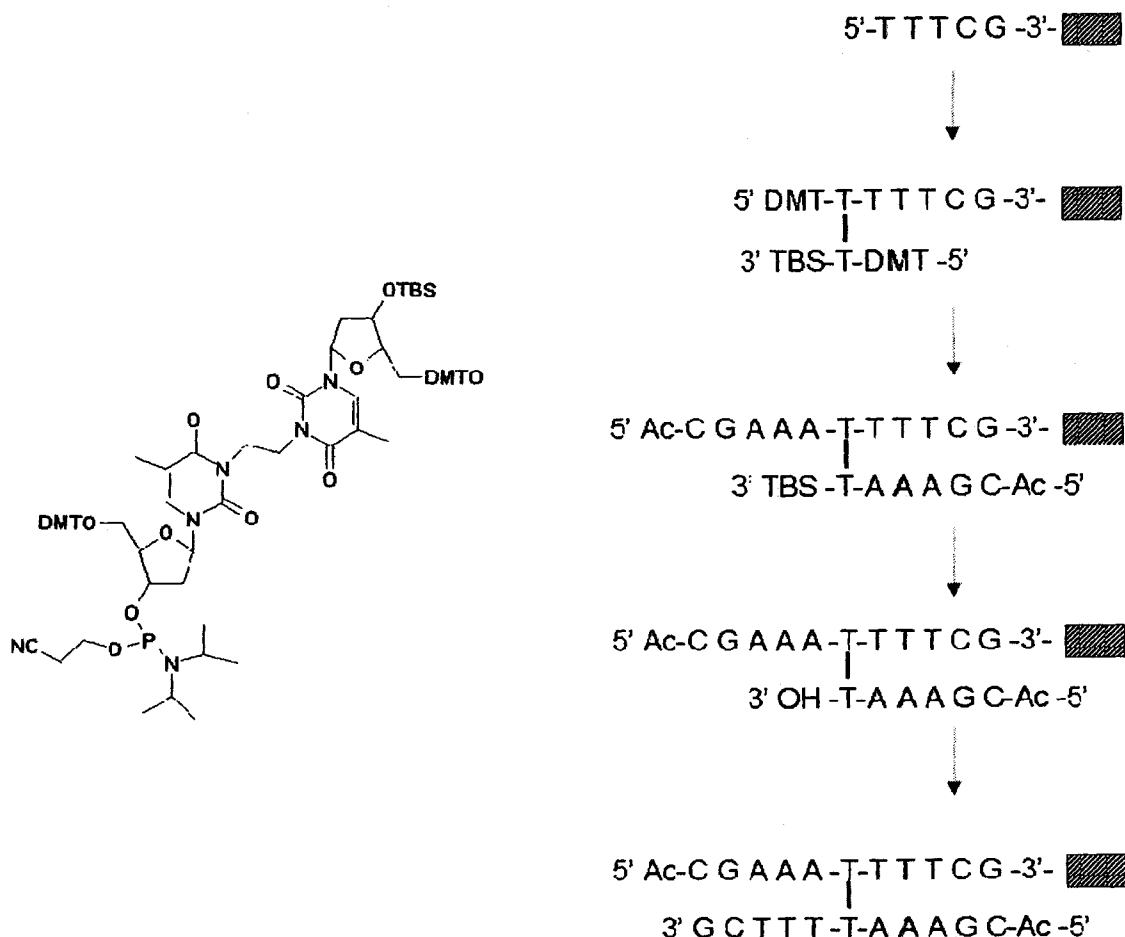
Figure 19: intercalation d'un psoralène dans l'ADN et réaction avec une ou deux Thd (d'après (Noll et al. 2006)).

Les psoralènes sont des agents thérapeutiques utilisés en photodermatologie. Ce sont des molécules bifonctionnelles pontant les deux brins d'ADN (Noll et al. 2006). Ces agents sont activés par la lumière UVA. Leur structure planaire leur permet de s'insérer dans l'ADN, où ils induisent une photoaddition 2+2 préférentiellement sur les liaisons 5-6 des T, avec une affinité particulière pour les T flanquées d'adénine en 5' ou en 3' (**Figure 19**). Afin d'étudier les effets de séquences qui régissent l'addition d'un psoralène dans l'ADN, puis les effets de la déformation de l'ADN ponté par le psoralène et enfin la réparation enzymatique du pontage, la synthèse chimique d'un ADN modèle ponté par le psoralène a été effectuée (Kobertz et Essigmann. 1997). La stratégie de synthèse a impliqué d'abord de synthétiser *de novo* une thymine liée au psoralène, afin de simuler la première alkylation du psoralène sur une thymine (Kobertz et Essigmann. 1996). Ensuite le synthon obtenu a été modifié pour être inséré dans un oligonucléotide par la méthode classique de synthèse automatique de l'ADN. Après hybridation de l'oligonucléotide contenant l'adduit T-psoralène avec son ADN complémentaire, un pontage T-psoralène-T a été obtenu par photolyse des duplexes, en rendement élevé (84%) et sans les produits de monoalkylation habituellement formés avec le psoralène en forme libre, justifiant le choix de cette stratégie de préparation du pontage, qui associe la synthèse organique et une approche photochimique.

### ***I-4.3.2 Synthèse d'un pontage entre Thd séparées de 3 longueurs différentes***

Une méthode de synthèse particulière a été mise au point dans le but d'obtenir des pontages d'ADN de structure parfaitement définie entre deux Thy, et afin d'étudier

l'influence, sur la stabilité de l'ADN, de la longueur du lien entre les bases pontées (Wilds et al. 2004). Le principe est le suivant : en premier, des pontages sont synthétisés entre deux nucléosides Thd libres. Trois pontages T<sup>A</sup>T sont synthétisés, contenant chacun un bras espaceur de longueur différente entre les N<sup>3</sup> des cycles de T. Les longueurs des



**Figure 20 :** à gauche, dimère T<sup>A</sup>T avant son insertion dans l'ADN, à droite, schéma de synthèse des oligonucléotides incorporant le pontage (d'après (Wilds et al. 2004)).

espaceurs sont de 2, 4 ou 7 carbones. Après l'étape de synthèse des dimères de nucléosides, les extrémités 5' des deux sucres sont protégées par des groupements

diméthoxytrityle (DMT), tandis qu'une seule des deux extrémités 3' est activée par un groupement phosphoramidite. L'autre extrémité 3' est protégée par un groupement *tert*-butyldimethylsilane. À partir de l'extrémité 3' activée, les nucléosides pontés sont liés à la séquence préalablement synthétisée (**Figure 20**). Dans l'étape suivante, les extrémités 5', déprotégées par élimination du groupement DMT, sont allongées de la séquence 5'-AAAGC-3'. Cette addition est effectuée par synthèse automatique, et est identique sur les deux brins, ce qui conduit à la formation d'un duplexe ayant une séquence palindromique. Après élimination du groupement *tert*-butyldimethylsilane, le dernier alcool libre du sucre du pontage T<sup>A</sup>T partiellement inséré est le 3'. Généralement la synthèse automatique d'oligonucléotides est effectuée par extension des séquences dans la direction 3' vers 5', par l'utilisation de nucléosides tritylés en 5' et activés par un phosphoramidite en 3'. L'allongement de l'extrémité 3' du sucre a été effectué en utilisant des synthons protégés en 5' par un groupement phosphoramidite et en 3' par un groupement DMT. L'obtention des oligonucléotides contenant trois longueurs de pontages T<sup>A</sup>T a permis d'étudier les différentes stabilités de l'ADN selon l'espaceur ainsi que la réparation des lésions de l'ADN par des extraits cellulaires et dans des cellules entières.

## Hypothèses-Objectifs

La détermination des mécanismes d'oxydation à un électron de l'ADN a fait appel initialement à des études impliquant des composés modèles tels que les bases, les nucléosides et les nucléotides. Il est apparu nécessaire d'étendre ces travaux à des systèmes plus complexes reflétant mieux la réalité structurale de l'ADN. La liaison de MQ à l'ADN par un lien covalent s'inscrit dans la suite des études d'oxydation des nucléosides par MQ.

MQ est une quinone impliquée dans des réactions chimiques diverses. *In vivo* MQ est potentiellement un radiosensibilisateur des cellules tumorales hypoxiques (Lamson et Plaza. 2003), et qui agit en synergie avec des agents anticancéreux. Il a été démontré qu'*in vitro* MQ liée à l'ADN induit des pontages interbrins par la réactivité du groupement méthide généré lors de la réduction de la quinone (Chatterjee et Rokita. 1990; Chatterjee et Rokita. 1991; Chatterjee et Rokita. 1994), et provoque aussi une alkylation de dAdo par le même mécanisme (Wang et Liu. 2002).

Notre intérêt pour MQ s'explique en premier par la capacité que possède ce photosensibilisateur à oxyder les quatre bases monomères de l'ADN. Cette propriété fut exploitée principalement lors de l'élucidation des mécanismes de dégradation photosensibilisée de nature oxydative des bases puriques par la lumière UVA. MQ simule l'effet direct des radiations ionisantes sur l'ADN, par la génération du radical cation des bases, selon un mécanisme de photosensibilisation de type I. Notre objectif initial était de déterminer si MQ pourrait constituer un modèle d'étude des radiations ionisantes dans l'ADN comme cela a été démontré précédemment pour des composés isolés. L'effet

direct des radiations sur l'ADN est négligeable en solution du fait de la prépondérance des espèces radicalaires comme le radical OH issu de la radiolyse de l'eau, qui dégrade l'ADN par effet indirect. Cependant l'oxydation par effet direct provoque le phénomène de transfert de charge dans l'ADN, dont les répercussions sur la mutagenèse et la réparation des dommages ne sont pas élucidées. Par exemple, il a été suggéré que la base facilement oxydable 8-oxodGuo protège les constituants voisins suite à l'oxydation, en concentrant sur elle les processus de dégradation (Kanvah et Schuster. 2005). À l'inverse les bases oxydées exercent un effet sensibilisateur sur l'ADN (Kanvah et Schuster. 2005). Il est aussi proposé que les lésions sont reconnues à distance par les enzymes de réparation et possiblement réparées à distance par ces même enzymes au moyen du transfert de charge (Vicic et al. 2000; Yavin et al. 2005), grâce au changement de potentiel d'oxydation que ces bases induisent dans l'ADN.

La synthèse chimique de MQ liée à l'ADN était notre première étape à atteindre. Le lien covalent élaboré entre les deux molécules a pour but d'augmenter l'interaction entre le photosensibilisateur et le polymère, d'une part, et d'autre part de contrôler le lieu d'injection du cation radical créé par MQ dans l'ADN.

Ensuite nous avons voulu associer différentes approches d'étude du processus du TC, notre hypothèse étant que l'analyse du TC par la seule technique d'électrophorèse était insuffisante. Notre objectif était de construire une étude du TC basée sur la caractérisation des dommages. Afin d'avoir d'une vision globale des conséquences oxydatives du transfert de charge induit par MQ dans l'ADN, nous avons utilisé les techniques d'électrophorèse, de CLHP-UV et de CLHP-UV-EC.



Puis nous avons comparé à MQ le transfert de charge produit avec AQ, qui est une molécule de référence dans l'étude du TC.

Enfin, après la découverte de la capacité importante de nos systèmes d'étude à générer des produits de pontage dans l'ADN, nous avons voulu identifier précisément leurs structures.

## **Chapitre II : article 1**

*Nucleic Acids Res.* 32, 6154-6163 (2004).

## Electron Transfer in DNA Duplexes containing 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone

Francois Bergeron, Daniel Houde, Darel J. Hunting and J. Richard Wagner

Group in the Radiation Sciences, University of Sherbrooke, Sherbrooke (Quebec) Canada J1H 5N4, and the Research Center of Aging, Sherbrooke University Geriatrics Institute, 1036 Rue Belvedere Sud, Sherbrooke (Quebec) Canada J1H 4C4.

Corresponding author:

Prof. J. Richard Wagner, Research Center of Aging, Sherbrooke University Geriatrics Institute, 1036 Rue Belvedere Sud, Sherbrooke (Quebec) Canada J1H 4C4. Phone: (819) 821-7011 ext. 2286. Fax: (819) 829-7141. Email: Richard.Wagner@Usherbrooke.ca

Keywords: Charge transfer, single electron oxidation, photosensitization, menadione, DNA interstrand crosslinks

Running Title: Electron Transfer in MQ-DNA Duplexes

### **ABSTRACT**

2-Methyl-1,4-naphthoquinone (menadione, MQ) was linked to synthetic oligonucleotides and exposed to near-UV light to generate base radical cations in DNA. This model system of electron transfer induced alkali-labile breaks at GG doublets, similar to anthraquinone and metallointercalators systems. In sharp contrast to other systems, the

photolysis of MQ-DNA duplexes gave interstrand crosslinks and alkali-labile breaks at bases on the complementary strand opposite the MQ moiety. For sequences with an internal MQ, the formation of crosslinks with A and C opposite the MQ moiety was 2-3-fold greater than that with G and T. The yield of crosslinks was more than 10-fold greater than that of breaks opposite MQ, which in turn was more than 2-fold greater than breaks at GG doublets. The yield of damage at GG doublets greatly increased for a sequence with a terminal MQ. The distribution of base damage was measured by enzymatic digestion and HPLC analysis (dAdo > dThd > dGuo > dCyd). The formation of novel products in MQ-DNA duplexes was attributed to the ability of excited MQ to generate the radical cations of all four DNA bases; thus, this model system provides an ideal model system to study of the effects of ionizing radiation.

## INTRODUCTION

Model systems of electron transfer in DNA have been exploited to understand the biological effects of ionizing radiation, to probe the structure and biochemistry of DNA, and to develop electronic devices on a molecular scale (1). The majority of experimental systems involving DNA take advantage of photochemical electron transfer to inject electron-holes into DNA at specific sites. Three mechanisms have been proposed to account for the formation of DNA damage at a distance from the initial site of electron hole injection: long-range tunneling, multistep hopping, and polaron-mediated hopping. The mechanism of long-range tunneling is supported by the fast and efficient rates of electron transfer induced by tethered metallointercalators with DNA damage observed as far away as 60 base-pairs (2-4). In contrast, the mechanism of multistep hopping consists of a combination of superexchange and hopping events. It is supported by studies involving the photolysis of 4'-pivaloylated thymidine, stilbene hairpins, as well as by theoretical studies (5-7). The efficiency of DNA damage from G to a site of lower oxidation potential, GGG, separated by 1-3 AT base pairs falls off sharply with distance according to the superexchange hypothesis. The transport of electron holes is less efficient and dependent on separation distance when the bridge is composed of more than 3 AT base pairs, consistent with a mechanism of hopping (8,9). The insertion of GC base pairs within donor acceptor bridges containing multiple AT base-pairs greatly enhances the efficiency of electron hole transfer to remote GGG sites. Lastly, the mechanism of polaron mediated hopping is supported by studies using anthraquinones tethered to DNA duplexes (10-13). This model system is characterized by the formation of DNA damage at long distances, which falls off slowly with distance ( $\beta < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ ) and is sensitive to

DNA primary and secondary structure, particularly the presence of water molecules and ionic charges (12). The main difference between the two models of hopping is that the radical cation is centralized at a single base in multistep hopping but delocalized over several bases in polaron mediated hopping.

The chemical reaction of DNA radical cations terminates electron transfer in DNA, leading to the formation of stable products. In the majority of model systems, the detection of damage at a distance from the initial site of the radical cation is based on product analysis involving  $^{32}\text{P}$ -labeling and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Typically, the site of damage is revealed by heating DNA in hot piperidine to convert base or sugar modifications to breaks. This approach is very sensitive and permits the analysis of damage at specific sites in DNA. However, the drawback of this method is that hot piperidine does not convert all damaged sites into breaks and very little information is obtained about the structure of the damage. An alternative method is to use DNA repair enzymes, such as formamidopyrimidine N-glycosylase and endonuclease III, to cleave DNA at sites of base damage. Again, this method is not quantitative because not all damage is converted to breaks and the activity of the enzymes varies from batch to batch. For example, some studies on electron transfer in DNA report several fold more formamidopyrimidine N-glycosylase-sensitive breaks compared to piperidine-induced breaks (14), whereas others report comparable levels (15-17). Because of the complex nature of DNA damage, and the multitude of intermediate species, it is important to further characterize this damage and to develop appropriate methods of analysis.

2-Methyl-1,4-naphthoquinone (menadione; MQ) is an excellent near-UV photosensitizer that induces one-electron oxidation of nucleic acid components (18-27).

The mechanism of oxidation involves electron transfer from pyrimidine and purine bases to triplet excited MQ, which generates the corresponding radical cations of DNA bases and MQ radical anions, respectively (22). The rate of reaction of triplet MQ is nearly diffusion controlled ( $k > 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) with several nucleic acid components, including thymidine (dThd), 2'-deoxycytidine (dCyd), 2'-deoxyadenosine (dAdo), and 2'-deoxyguanosine (dGuo), as well as the corresponding monophosphates (22). In addition, the yield of stable products from dThd was equal to the yield of triplet MQ (66%), indicating that 100% of dThd radical cations transform to stable products (22).

Previously, we characterized a large number of products from the MQ-photosensitized oxidation of dThd, dCyd and 5-methyl-2'-deoxycytidine (23,25-27). However, the photosensitized oxidation of DNA with free MQ is greatly limited because of the low rate of reaction of triplet MQ with DNA and the relatively high rate of self-quenching. In this work, we have overcome this problem by attaching the MQ moiety via a short chain amino linker to DNA. These studies demonstrate the formation of novel products, including DNA interstrand crosslinks, piperidine-labile breaks opposite to the MQ moiety, and loss of dAdo, dThd, dGuo and dCyd, all of which are consistent with the formation of radical cations of all four DNA bases and their transformation to stable products.

## MATERIALS AND METHODS

**General Methods.** Chemical reagents were obtained from Aldrich unless otherwise stated. N-bromosuccinimide was recrystallized in hot water before use. T4 polynucleotide kinase was obtained from USB Corporation and [ $\gamma$ - $^{32}$ ATP] was purchased from Perkin Elymer Life Sciences. Nuclease P1 and alkaline phosphatase were from Roche. Oligonucleotides were provided by AlphaDNA (Montreal) and their mass was verified by MALDI-TOF analyses. Uni-link AminoModifier phosphoramidite was obtained from Clontech and incorporated into an internal position during oligonucleotide synthesis. HPLC-UV analysis was carried out on Alliance systems (Waters 2795 or 2690) connected to a dual wavelength UV detector (Waters 2487) and Millenium workstation (Waters version 4).  $^1\text{H}$ -NMR spectra were recorded using a Bruker 300 MHz spectrometer. MALDI-TOF analysis was performed on a Biflex system (Bruker). UV melting and CD measurements were recorded on a JASCO J810 spectropolarimeter.

**2-Bromomethyl-6-methylnaphthalene.** This synthesis was adapted from Futamura et al. (28). N-bromosuccinimide (NBS, 630 mg, 3.5 mmol) was added to a solution of 2,6-dimethylnaphthalene (500 mg, 3.2 mmol) of anhydrous benzene (64 mL). The solution was bubbled with nitrogen and irradiated for 40 min at room temperature with a 250 W medium pressure Hg lamp (Blak-Ray/Ultraviolet products) equipped with an UV filter ( $\lambda \geq 500$  nm). The mixture was filtered, evaporated to dryness and purified by flash column chromatography (silica gel, toluene/hexane = 20:1).  $R_f = 0.7$ . Yield 526 mg (70%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.5 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 4.65 (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{Br}$ ), 7.3-7.9 (m, 6H,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_7$ ,  $\text{H}_8$ ,  $\text{H}_9$ ).



**6-Bromomethyl-2-methyl-1,4-naphthoquinone.** This synthesis was adapted from Antonini et al. (29). 2-Bromomethyl-6-methylnaphthalene (1 g, 4.2 mmol) was dissolved in 17 ml of 90% acetic acid and maintained in a melting ice bath at 10°C. Chromium (VI) oxide (1.3 g, 13 mmol) was dissolved in 3.6 ml of 50% acetic acid and added dropwise to the solution of naphthalene while stirring for 40 min. The mixture was then heated at 50°C for 30 min, quenched with cold water and maintained on ice for 5 min to allow maximum recovery of brominated MQ. The crude product was collected by filtration, dissolved in ethyl acetate, dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporated to dryness and purified by flash column chromatography (silica gel, hexane/ethyl acetate = 9:1; R<sub>f</sub> = 0.2). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2.5 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 4.85 (s, 2H-CH<sub>2</sub>Br), 7.0 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 7.85-8.05 (m, 3H, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>).

**6-Hydroxymethyl-2-methyl-1,4-naphthoquinone.** 6-Bromomethyl-2-methyl-1,4-naphthoquinone (500 mg, 1.9 mmol) was refluxed in 15 mL water/dioxane (3:2) until the starting material was consumed as indicated by TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1). The solvent was evaporated and the product was subsequently used for the next step without further purification. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 2.3 (s, 1H, -CH<sub>3</sub>), 2.7 (s, 1H, -OH), 4.85 (s, 1H, -CH<sub>2</sub>), 6.85 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 7.7 (d, 1H, H<sub>7</sub>), 8.0 (m, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>8</sub>).

**2-Methyl-1,4-naphthoquino-6-carboxylic acid (5).** 6-Hydroxymethyl-2-methyl-1,4-naphthoquinone (190 mg, 0.95 mmol) was dissolved in 3.6 ml 90% acetic acid and maintained in a melting ice bath at 10°C. Chromium (VI) oxide (215 mg, 2.15 mmol) was dissolved in 1.2 ml 50% acetic acid and added drop-wise to 6-hydroxymethyl-2-methyl-1,4-naphthoquinone while stirring for 40 min. The black mixture was then heated at 50°C for 30 min, quenched with cold water and maintained on ice for 5 min. The crude product

was collected by filtration, dissolved in ethyl acetate, dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , evaporated to dryness and purified by flash column chromatography (silica gel,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 10:1$ ).  $R_f = 0.4$ . Yield 82 mg (40%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  2.1 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 7.0 (s, 1H,  $\text{H}_3$ ), 8.1 (d, 1H,  $\text{H}_7$ ), 8.3 (d, 1H,  $\text{H}_8$ ) 8.4 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 13.6 (s, 1H, acid).

**2-Methyl-1,4-naphthoquinone-6-carboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester (MQ-NHS ester).** This synthesis was adapted from Oswald et al.(30). The carboxylic acid derivative (**5**; 200 mg, 0.9 mmol), was dissolved in 40 mL anhydrous N,N-dimethylformamide (DMF), followed by the addition of dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 560 mg, 2.7 mmol) and N-hydroxysuccinimide (NHS, 320 mg, 2.8 mmol). The mixture was stirred overnight under argon and filtered. The filtrate was lyophilized, dissolved in 40 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , filtered again and evaporated to dryness. The product was then purified on reversed phase HPLC (ODS-AQ 25 cm x 10 mm i.d.; 2.5 ml/min, 50% acetonitrile/water, isocratic). Yield 112 mg (40%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  2.1 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 3.3 (s, 4H, succinimide), 7.1 (s, 1H,  $\text{H}_3$ ), 8.2 (d, 1H,  $\text{H}_7$ ), 8.45-8.55 (m, 2H,  $\text{H}_8$ ,  $\text{H}_5$ ).

**Conjugation of MQ-NHS ester with Oligonucleotides.** MQ-NHS ester was coupled to oligonucleotides by optimization of a standard protocol (31). The coupling reaction was carried out by mixing a solution of purified oligonucleotides containing amino modifier (200  $\mu\text{g}$ , 19.7 nmol), precipitated and dissolved in 200  $\mu\text{L}$  of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 mM buffer (pH 7.5), with a solution of MQ-NHS ester (0.5 mg, 3  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (200  $\mu\text{L}$ ). The reaction was complete after 7 h at  $37^\circ\text{C}$  as monitored by HPLC with dual detection at 260 and 340 nm (Yield > 90%).

**Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) Analyses.** Gel purified oligonucleotides were labeled at the 5' end with [ $\gamma$ - $^{32}$ ATP] using T4 polynucleotide kinase according to the standard procedure. Labeled DNA was immediately purified on Sephadex resin microcolumns and collected in 10 mM NaHPO<sub>4</sub> buffer (pH 7.0). The unlabeled MQ-conjugated and  $^{32}$ P-labeled complementary strands were subsequently hybridized by heating equal molar solutions (1  $\mu$ M) in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) for 5 min at 65°C in a water bath and then allowing the mixture to cool to 30°C (1 h). The extent of hybridization was 100% as indicated by non-denaturing gel electrophoresis (10%; 19:1 acrylamide/bis-acrylamide). During photolysis, MQ-DNA duplex (7  $\mu$ L) was withdrawn for PAGE analysis. The samples were divided into two equal aliquots for the analysis of DNA breaks, with and without piperidine treatment (1M piperidine, 90°C, 30 min). All samples were evaporated to dryness in a vacuum concentrator and suspended in denaturing loading buffer, heated to 80°C for 10 min, quenched on ice and then subjected to PAGE analysis on a 20% 19:1 acrylamide/bis-acrylamide denaturing gel (7 M urea). The gels were exposed overnight on a phosphor screen cassette and scanned using a Storm phosphorimager and Imagequant software (Molecular Dynamics).

**HPLC-UV Analysis.** MQ-conjugated and complementary strands (200  $\mu$ g each) were dissolved in 800  $\mu$ L of 10 mM phosphate buffer (pH 7.0). The mixture of oligonucleotides was heated for 5 min at 70°C in a water bath to allow for complete denaturation, and then the mixture was slowly cooled to room temperature over a period of 1 h. The resulting solution of MQ-DNA duplex (25  $\mu$ M) was exposed to near-UV photolysis (365 nm) and aliquots (75  $\mu$ L) of sample were collected at several time-points (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 and 180 min). For each aliquot, two HPLC-UV analyses were

performed. The analysis of oligonucleotides was carried out on a reversed phase column (ODS-AQ 250 x 4.6 mm; YMC) using a gradient starting at 92% solvent A and 8% solvent B for 5 min and going to 80% solvent A and 20% Solvent B in the next 24 min (0.5 %/min), where solvent A is composed of 25 mM triethylammonium acetate (TEAA; pH = 7.0 – 2.5% acetonitrile) and solvent B is composed of 95% acetonitrile – 5% water. The flow rate was 1 ml/min and the column was maintained at a temperature of 60°C.

The analysis of individual nucleosides in MQ-DNA duplexes was carried out by enzymatic digestion with P1 nuclease and alkaline phosphatase followed by HPLC-UV analysis of the mixture of nucleosides using the same column as above except that it was done under isocratic conditions with 10 % methanol in 10 mM sodium phosphate buffer (pH = 7.0) at a flow rate of 1 mL/min. Oligonucleotides and nucleosides were detected at 260 and 340 nm. The analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dGuo), 5-hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine, was carried by HPLC-UV (above) coupled to an electrochemical detector (Coulochem II, ESA Associates) with the electrodes in the flow cell (Model 5011) set at 200 and 400 mV versus Pd reference electrode for 8-oxo-dGuo, and 100 and 500 mV, for 5-hydroxypyrimidine

**Near-UV Photolysis.** Photolysis was carried out with a 1000 W Hg-Xe arc lamp (Oriel Corp.) fitted with an infrared filter and monochromator set at  $365 \pm 2$  nm (Spectral Energy). The beam of light was focused on a quartz cuvette (pathlength = 1 cm). The solutions were bubbled with oxygen for 20 min before photolysis and during photolysis. The incident photon fluence rate was estimated by actinometry using the photosensitized decomposition of dThd in the presence of MQ, as a standard photochemical reaction having a quantum yield of 66% (22). The rate of decomposition of dThd was determined

in separate experiments by isocratic HPLC using phosphate buffer (50 mM, pH 5.5) and 10% methanol as the mobile phase. The incident photon fluence rate of our photolysis set-up was  $1.26 \times 10^{-9}$  Einstein/min ( $\pm 20\%$ ) based on the known quantum yield of dThd decomposition (40% at 10 mM dThd) and the concentration of MQ (0.53 mM; OD=0.68). The quantum yields were calculated for experiments with a high concentration of MQ-DNA duplexes (HPLC analysis; 20-30  $\mu$ M; OD~0.06) because this gave a measurable absorption necessary for the calculation of absorbed photons. For experiments with low concentrations of duplex (1  $\mu$ M for PAGE analysis), the quantum yield was estimated by assuming the same yield of crosslink formation in HPLC and PAGE analyses.

**Melting Point and Circular Dichroism.** To determine the melting point, complementary DNA sequences (7  $\mu$ M; each strand) were annealed in 300  $\mu$ L of 10mM sodium phosphate buffer (pH 7.0). The solutions were placed in cuvettes with a 1 mm path length and the absorption was monitored at 260 nm from 20°C to 90°C, heating at a rate of 1°C/min. The melting point was determined from the first derivative plot of absorption against temperature (°C). For circular dichroism, the complementary DNA sequences (7  $\mu$ M; each strand) were annealed under the same conditions as above. The solutions were placed in cuvettes with a 1 mm path length and the absorption was monitored between 220 to 340 nm at 20°C.

## RESULTS

The synthesis of oligonucleotides containing MQ was very challenging. The standard procedure used for the incorporation of anthraquinone into oligonucleotides, via the synthesis of modified phosphoramidites, followed by their assembly into oligonucleotides (32), was not feasible in the case of MQ. The conjugation of 2-bromomethyl-1,4-naphthoquinone to N<sub>3</sub>-benzoyl-dibutylstannylene uridine led to extensive decomposition of the quinone moiety. In addition, the MQ moiety was sensitive to the alkali conditions required for the deprotection of oligonucleotides. Attempts to protect the quinone moiety by reduction and alkylation did not solve the above problems because the harsh conditions needed to regenerate MQ from the methoxyhydroquinone derivatives, such as AgO in weak acid, led to additional modifications of the oligonucleotide. Therefore, we resorted to an alternative approach based on the synthesis of the NHS ester of MQ followed by post-labeling with oligonucleotides containing a reactive amino group. The coupling reaction gave yields of >90% using a 150-fold excess of the ester to DNA in DMF/H<sub>2</sub>O. The structure of MQ-DNA was confirmed by MALDI-TOF analysis (*m/z*: measured, 10138.9; calculated, 10137.8). Attachment of MQ at an internal position (see sequence I; Chart 1) decreased the melting point (*T<sub>m</sub>*) of duplex oligonucleotide from 49.8°C for the non-modified complementary duplex to 47.2°C for the modified duplex. There was no difference in the CD spectra between non-modified and modified duplexes.

DNA damage in irradiated MQ-DNA duplexes was first examined by PAGE analyses of the <sup>32</sup>P-labeled complementary strand of sequences I-V (Chart 1; Figure 1). These analyses revealed the formation of interstrand crosslinks, piperidine-labile breaks

opposite the MQ moiety, and piperidine-induced cleavage at GG doublets. Several distinct bands appeared on denaturing PAGE analyses, which migrated slower than the parent oligonucleotide, consistent with the formation of interstrand crosslinks (see lane 2, figure 1). Upon treatment with hot piperidine, the majority of crosslinks (>50%) were converted to single strands that co-migrated with the parent  $^{32}\text{P}$ -labeled strand. Similar results were obtained for sequences II-V. In control experiments, there was no detectable damage when a  $^{32}\text{P}$ -labeled duplex containing a naphthalene moiety, in place of an MQ moiety, was irradiated in the presence non-labeled DNA duplex containing a MQ moiety. Thus, the formation of damage in MQ-DNA duplexes takes place by the reaction of excited MQ with the oligonucleotides attached to it, and not by the reaction with another oligonucleotide. In addition, the above experiments rule out the possibility that small diffusing species generated by MQ photolysis were sources of DNA damage.

The yield of damage was estimated by  $^{32}\text{P}$ -labeling and PAGE (Figure 2; Table 1). The formation of products was linear as a function of photolysis time except for crosslinks, which appeared to reach a plateau after long exposures (Figure 2). The major products were crosslinks with a quantum yield ranging from  $4.6 \times 10^{-4}$  to  $13.7 \times 10^{-4}$ , depending on the sequence. The yield of crosslinks was 2-3-fold greater for sequences in which the complementary stranded contained A and C compared to those with G and T opposite to the MQ moiety. The presence of A and C at this site also led to a greater percentage of crosslinks that transformed into single strands upon treatment with hot piperidine. In comparison to crosslinks, the quantum yield of piperidine-labile breaks opposite MQ was 0.18 to  $0.66 \times 10^{-4}$  (10 to 68-fold lower than crosslinks). These breaks occurred at the base directly opposite MQ (A,G,T,C) as well as at neighboring bases

((T(3') and T(5')) with a bias toward damage at T(3') for sequences in which G, T, and C were opposite MQ. Interestingly, the total damage was about 2-fold greater in sequences containing pyrimidines (C =T) compared to those containing purines (G >A) opposite to the MQ moiety.

The total yield of breaks at GG<sub>3</sub> and GG<sub>4</sub> ranged from  $0.13 \times 10^{-4}$  to  $0.21 \times 10^{-4}$  for sequences in which MQ was attached to an internal position (I-IV). This damage was greater for proximal GG doublets (GG<sub>3</sub>) than for distal GG doublets (GG<sub>4</sub>). In addition, there was usually more damage on the 5'-side compared to the 3'-side of GG doublets although this difference did not persist for distal GG doublets in sequences I-IV. Similar yields and trends were observed for GG doublets on the 3'-side of MQ (GG<sub>1</sub> and GG<sub>2</sub>; see Figure 1); however, it was difficult to measure the yields of damage at GG<sub>1</sub> and GG<sub>2</sub> because of interference from parent <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotides. In contrast to sequences I-IV, the yield of damage at GG doublets dramatically increased for sequences in which MQ was attached to the 5'-terminus. This damage was 12-fold higher for a proximal GG doublet (GG<sub>1</sub>) compared to a distal one (GG<sub>2</sub>), and was more pronounced for the 5'-side compared to the 3'-side of the GG doublet. No significant increase in breaks was observed for more distant GG doublets in sequence V (GG<sub>3</sub> and GG<sub>4</sub>).

The formation of damage in sequence I with A opposite the MQ moiety was examined in greater detail by HPLC-UV. These analyses showed losses in UV absorption of both the complementary and MQ-containing strands, with a concomitant increase in new oligonucleotide products (Figures 3 and 4; Table 2). The initial rates of decomposition indicated that the MQ-conjugated strands disappeared at a faster rate than the complementary strands (Figure 4a). This can be attributed to greater damage of the



MQ-containing strand compared to the complementary strand; for example, since the two strands contribute equally to the formation of the crosslinked oligonucleotide products, the loss of the MQ-strand, excluding crosslink formation, is approximately 3-fold greater than the loss of the complementary strand, excluding crosslink formation (Table 2).

Interestingly, the total absorption of oligonucleotides at 260 nm decreased by 20% during photolysis as measured by HPLC-UV. This decrease of absorption was not due to decomposition of the oligonucleotides but rather to a hypochromatic effect resulting from the rapid re-annealing of crosslinked strands before their detection by HPLC-UV. When non-modified oligonucleotide duplexes were injected into the HPLC column, they eluted as well separated single strands under our conditions of analysis. Direct analysis of MQ-DNA duplexes during photolysis indicated no significant change in absorption of the solution at 260 nm (<5%). To verify that the new oligonucleotide products detected by HPLC-UV were interstrand crosslinks in MQ-DNA duplex, the products were purified by HPLC-UV, labeled with  $^{32}\text{P}$ -radioisotope, and then subjected to denaturing PAGE analyses. The resulting products migrated in the same region as the crosslinked products observed in irradiated  $^{32}\text{P}$ -labeled MQ-DNA duplex (data not shown). The ratio of absorption at 260/340 nm for the interstrand crosslinked products (ratio=88) was approximately half the value for the MQ-containing strand (ratio=150), consistent with the presence of both the complementary and MQ strands.

The decomposition of individual nucleosides in irradiated MQ-DNA duplex I was investigated by enzymatic digestion with P1 nuclease and alkaline phosphatase followed by HPLC-UV analysis of dCyd, dThd, dGuo, dAdo (Figure 4b; Table 2). Initially, we attempted to purify the MQ-containing and complementary strands by HPLC-UV and

then determine their nucleoside composition; however, this led to too much variation in the data due in part to cross-contamination of the peaks. Thus, the entire MQ-DNA duplex was taken for enzymatic digestion and HPLC-UV analysis. The quantities of dAdo, dThd and dGuo were normalized to that of dCyd, the nucleoside with the lowest rate of decomposition, in order to correct for variations in DNA precipitation and digestion between time-points. According to these results, the yield of damage for individual nucleosides was greatest for dAdo ( $dAdo > dThd > dGuo > dCyd$ ) and the sum of this damage was 4.4-fold greater than the yield of crosslinked products.

## DISCUSSION

MQ-photosensitized oxidation of DNA components has been extensively studied by flash photolysis, electron spin resonance, and detailed product analyses (21,22,25-27). For intermolecular reaction between excited MQ and DNA components, the mechanism of oxidation involves electron transfer generating MQ radical anions and DNA base radical cations. It is reasonable to propose a similar mechanism for MQ-DNA duplexes. The low yield of damage in MQ-DNA duplexes compared to reactions of free MQ and nucleosides can be attributed to the overwhelming back-transfer of initial radical ion pairs in MQ-DNA duplexes. The reaction of MQ radical anions with oxygen likely competes with back-transfer permitting DNA radicals to eventually transform into products. We propose that initial electron transfer accounts for the formation of DNA damage, including interstrand crosslinks, breaks opposite MQ and breaks at GG doublets (Scheme 1).

### **Interstrand crosslinks in MQ-DNA duplexes**

The structure of one interstrand crosslink in sequence I consisted of two adenine residues linked via the N6 of one adenine (next to MQ) and the C8 of another adenine on the complementary strand (33). This is consistent with the formation of crosslinks in MQ-DNA duplexes by deprotonation of initial adenine radical cations, giving rise to adenine N6 radicals, which subsequently undergo addition to another adenine on the opposite strand. A surprising feature of these crosslinks was their tendency to rupture into two non-modified adenine components upon heating under neutral or alkali (piperidine) conditions. The same chemistry probably accounts for the loss of crosslinks upon treatment with hot piperidine of sequence I with A opposite MQ. Changing the base

opposite MQ also leads to crosslinks, suggesting the formation of new crosslinks in which A is linked to C, T and G (this work). Interestingly, the yield and lability of these crosslinks is similar for sequences with either A or C opposite MQ (Table 1). Thus, it is reasonable to propose that adenine N6 radicals generated on the MQ-conjugated strand can also attack cytosine in sequences with C opposite MQ, as in the formation of A-A crosslinks. Previously, the formation of crosslinks with cytosine was proposed to involve the reaction of cytosine N3 radicals with another cytosine base in dinucleotides (34). On the other hand, sequences with either G or T opposite MQ gave crosslinks with a lower yield and ones that were less sensitive to piperidine treatment, compared to sequences with either A or C opposite to MQ. Although the reactions of carbon-centered radicals with guanine and adenine have been observed in dinucleotides and oligonucleotides (35,36), the same reactions with amino radicals have not been reported. Previously, the photolysis of DNA duplexes containing ruthenium tetraazaphenanthrene complexes was reported to produce crosslinks involving the addition of phenanthrene ligands to guanine radical cations on the opposite strand (37). It should also be noted that near-UV photolysis of poly-A in the presence of MQ increases of Rayleigh scattering, suggesting the formation of crosslinks; however, the yield of these products was at least 50-fold less efficient for single stranded DNA than for poly-A, and there was no significant increase of this damage for double stranded DNA (38).

**Piperidine-induced cleavage opposite to the MQ moiety.**

The induction of damage at bases opposite the photosensitizer represents a new type of damage in model systems of electron transfer in DNA. Although similar damage has been reported in rhodium complexes, it is induced by photolysis at 313 nm as a

means to mark the position of the photosensitizer in oligonucleotides (39). However, the structure of strand breaks in the two systems is different because the breaks in rhodium complexes are produced immediately, whereas those in MQ-DNA duplexes are predominantly (>90%) revealed only after treatment with hot piperidine. Another example of sugar damage induced by base radicals involves the abstraction of H-atoms from the sugar moiety by uracil-5-yl radicals, generated by near-UV photolysis of 5-bromouracil in DNA (40). A similar reaction involving adenine N6 radicals explains the formation of breaks opposite the MQ moiety in MQ-DNA duplexes.

### **Electron transfer induced damage at GG doublets**

The features of damage at GG doublets in MQ-DNA duplexes were similar to other model systems of electron transfer in DNA. There was generally a 3 to 5-fold difference in cleavage at the 5'-G compared to 3'-G sites of GG doublets (Table 1). In some sequences, the yield of damage at GG doublets was low and did not show a clear bias toward damage at the 5'-side. The  $\beta$  value or fall-off of damage with distance was estimated by comparing the intensity of total 3' and 5' damage between two GG doublets. For MQ-DNA duplexes in which the MQ moiety was attached at a central position (sequence I), the  $\beta$  value was  $0.05 \text{ A}^{-1}$  based on the average fall-off for GG<sub>1</sub>/GG<sub>2</sub> and GG<sub>4</sub>/GG<sub>3</sub> in this sequence. In contrast, the difference in damage between the first and second GG doublets in MQ-DNA duplexes containing terminally attached MQ indicated a steep decrease in the intensity of damage with a estimated  $\beta$  value of  $0.65 \text{ A}^{-1}$ . The low  $\beta$  value of  $0.05 \text{ A}^{-1}$  is very similar to that reported for anthraquinone duplexes ( $0.005$  to  $0.06 \text{ A}^{-1}$ ), whereas the high value of  $0.65 \text{ A}^{-1}$  is close to the values reported for electron transfer in several model systems, in particular, those with 4'-pivaloylated thymidine,

stillbene hairpins, and 2-aminopurine (41). The difference in  $\beta$ -values depending on the location of MQ-DNA duplexes (central or terminally located) is probably related to changes in the interactions of the MQ moiety with bases at the site of attachment. For example, the  $\beta$  value for the quenching of fluorescent analogs of adenine ranged from 0.1 to 1.0 depending on the ability of the analog to stack with other bases in duplex DNA (42). The yield of damage at GG doublets ( $GG_3 + GG_4$ ) of MQ-DNA duplexes ranged from 0.05 to  $0.21 \times 10^{-4}$  for sequences with centrally-attached MQ to as much as  $2.5 \times 10^{-4}$  for sequences with MQ attached at the terminus. The large difference between the two sequences indicates that electron transfer to GG doublets is favored for electron-hole injection at the terminus. In comparison, the yield of breaks at GG doublets for DNA duplexes containing metallointercalators (Rh and Ru) range from  $0.02$ - $0.9 \times 10^{-4}$  and for anthraquinone-DNA duplexes from 0.2 to  $500 \times 10^{-4}$  (4,43).

### **Decomposition of individual nucleosides**

Photolysis of MQ-DNA duplexes leads to the loss of A, T, G and C (Figure 1; Table 2). The loss of A and T within sequence I in which A is opposite to the MQ moiety can be explained in part by the formation of interstrand crosslinks. In this case, the apparent loss of individual DNA bases is attributed to the inability of P1 nuclease to digest DNA to 5'-monophosphates because of the presence of damaged bases which inhibit enzyme activity (44,45). Thereby, the formation of A-A crosslinks results in the "disappearance" of two A residues as well as one T residue because the nucleoside on the 3'-side of modified A residue resists P1 nuclease digestion. Assuming that A residues are only consumed by the formation of crosslinks, a large proportion of crosslinks must contain either one or no adenine residues ( $-15.9$  vs.  $+8.0$ ; Table 1). The major pathway of

decomposition of dGuo appears to involve the formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine ( $\Phi = +9.2 \times 10^{-4}$ ). This damage is not directly piperidine-labile, and thus, it is not converted to breaks upon treatment with piperidine (46). In the case of dCyd, there was no marked formation of single oxidation products of dCyd, including 5-hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine. The loss of dCyd, however, indicated that the initial electron hole (i.e. A radical cations) migrated 3 base pairs away in order for it to reach the closest C residue on the MQ-containing strand.

### **Relevance to electron transfer in DNA.**

The idea that electron transfer in DNA leads to damage at all four DNA bases is not accounted for by current theories of electron transfer in DNA. The formation of novel damage, including interstrand crosslinks and piperidine breaks opposite the MQ moiety in duplex DNA indicates that there is a fundamental difference between the photochemistry of MQ and other photosensitizers used to study electron transfer in DNA. To explain the formation of unique products in MQ-DNA duplexes, we propose that excitation of MQ initially leads to the formation of the radical cations of all four DNA bases. In contrast, the excitation of other photosensitizers leads to damage at G residues probably because they specifically generate G radical cations, and once this intermediate is generated, the possibility of oxidizing other bases is highly unfavorable because of the low oxidation potential of G. Interestingly, the formation of damage at sites other than G has been documented in other systems, for example, the photolysis of DNA by 193 nm light and high intensity laser photolysis (47,48). It should also be noted that the photosensitization of DNA with free MQ in solution also leads to damage at several DNA

bases (47-49). Indeed, the ability of triplet excited MQ to oxidize all four DNA bases has been demonstrated in studies with free MQ and nucleosides (18-23,25-27). In one study, the photosensitized oxidation of dCyd, dThd and dAdo was 100-fold more efficient than that of dGuo, indicating the low reactivity of dGuo radical cations, compared to other base radical cations (49). The lack of dGuo decomposition may be attributed to the relatively long lifetime of dGuo radical cations leading to their efficient recombination with MQ radical anions. In contrast, MQ-photosensitized oxidation of a mixture of the four nucleosides leads to greater oxidation of dGuo at the expense of the other nucleosides, indicating that the radical cations of dAdo, dCyd and dThd favorably accept an electron from dGuo to give dGuo radical cations. Therefore, the formation of damage in DNA duplexes covalently linked to MQ may be a balance between the fast kinetics of the deprotonation and hydration reactions of C, T and A radical cations, which leads to several novel products observed in this work, and the relatively slow kinetics of charge migration to G, which leads to piperidine labile breaks at GG doublets.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to the Canadian Institutes of Health Research (MOP-1249) for financial support and Fonds de la Recherche en Santé du Québec for salary support (JRW). We thank Sylvain Cecchini for helpful discussions.



## LEGEND OF FIGURES

**Figure 1.** Detection of DNA damage by PAGE analysis. Near-UV photolysis (365 nm) was carried out with  $^{32}\text{P}$ -labeled MQ-DNA duplex (Chart 1) at a concentration of 1  $\mu\text{M}$  (4  $\mu\text{g}/200\text{ }\mu\text{L}$  in 10 mM sodium phosphate buffer (pH = 7.0). PAGE analysis was carried out without further treatment (left side of gel; Piperidine (-)) and immediately following treatment with 1 M piperidine for 30 min at 90°C (right side; Piperidine (+)). Lanes 1 through to 7 correspond to progressively longer times of photolysis in the order of 0, 5, 10, 15, 30, 60 and 120 min.

**Figure 2.** Quantitation of damage by PAGE analysis. DNA damage was based on the amount of radioactivity in  $^{32}\text{P}$ -labeled oligonucleotides (Figure 1). Figure 2a: interstrand crosslinks before piperidine treatment (-●-) and crosslinks after piperidine treatment (-■-). Figure 2b: piperidine induced cleavage at A opposite MQ (-▲-) and T (3'-) opposite MQ (-▼-), and at the 5'-side (-Δ-) and 3'-side (-▽-) of GG-3 (5'). Control experiments (-○-) correspond to the photolysis of  $^{32}\text{P}$ -labeled DNA duplex containing a naphthalene moiety in the presence of non-labeled MQ-DNA duplex.

**Figure 3.** Detection of oligonucleotide products by HPLC-UV analysis. Near-UV photolysis (365 nm) was carried out with non-labeled MQ-DNA duplex (Chart 1) at a concentration of 25  $\mu\text{M}$  (400  $\mu\text{g}/800\text{ }\mu\text{L}$ ) in 10 mM sodium phosphate buffer (pH = 7.0). The formation of products was monitored from 0 to 180 min of photolysis with time-points shown for 0 and 180 min (—) and 30, 60 and 120 min (---).

**Figure 4.** Quantitation of DNA damage by HPLC-UV analysis. Figure 4a shows the loss and gain of oligonucleotides based on UV absorption at 260 nm: complementary strand (-▲-); MQ-containing strand (-▼-) and interstrand crosslinks (-●-); error bars ( $\pm\text{SD}$ )

represent the average of three independent experiments with single analysis of each time-point. Figure 4b shows the loss of dCyd (-○-) (insert) and the relative loss (normalized to dCyd) of dGuo (-◇-), dThd (-▽-), and dAdo (-△-). The initial slope for the loss of each nucleoside was determined by fitting a second order polynomial to the data (average of 3 experiments with multiple analyses for each time-point). The loss of dCyd was statistically significant ( $r^2=0.56$ ;  $P=0.016$ ) as well as for the normalized losses of dAdo ( $r^2=0.91$ ;  $P=0.002$ ), dThd ( $r^2=0.75$ ;  $P=0.001$ ) and dGuo ( $r^2=0.80$ ;  $P=0.009$ ).

**Figure 1 (Bergeron et al.)**

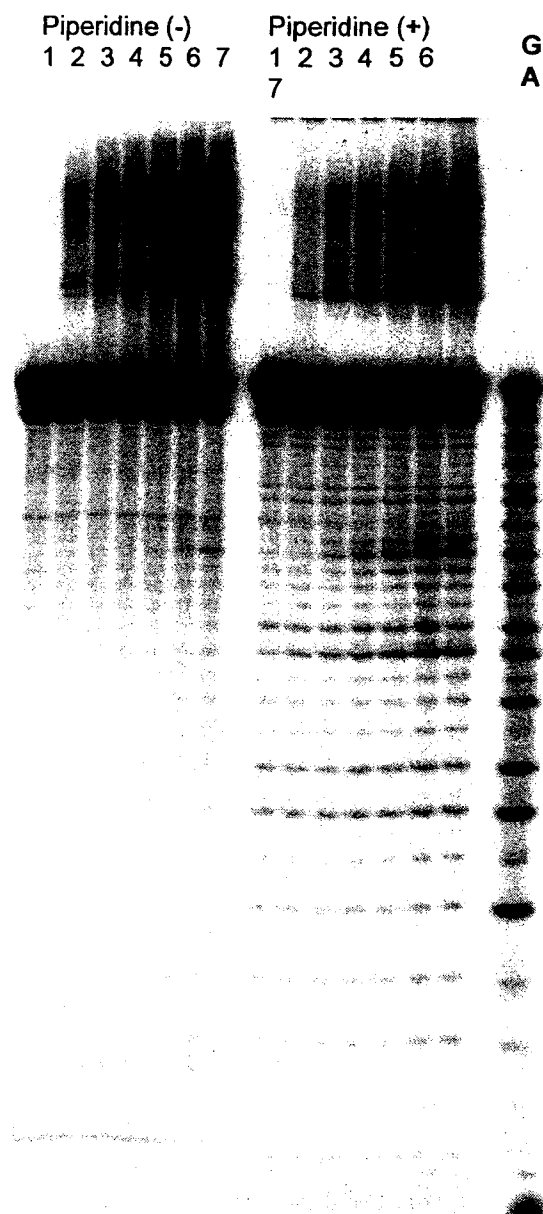
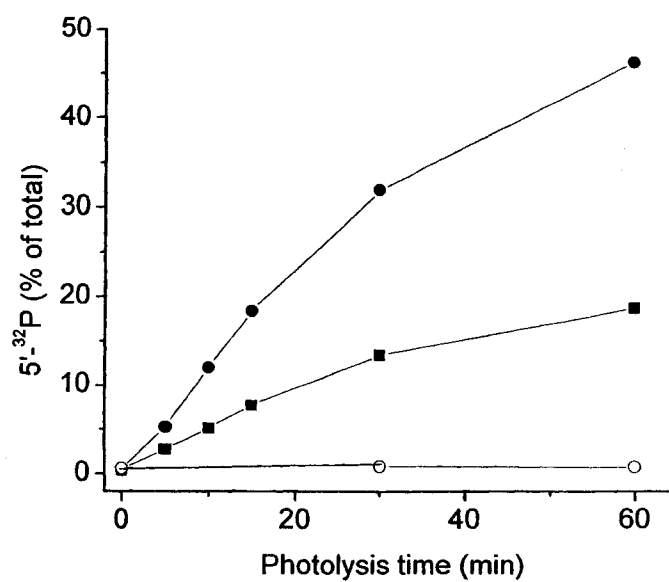
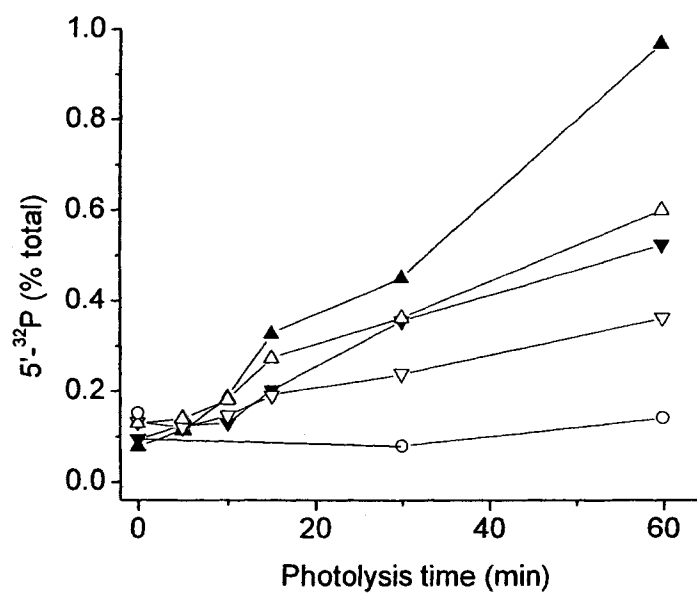


Figure 2 (Bergeron et al.)

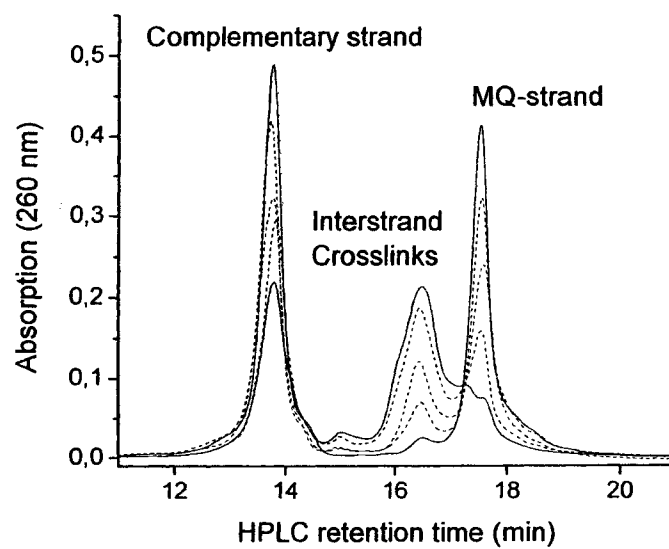
a)



b)

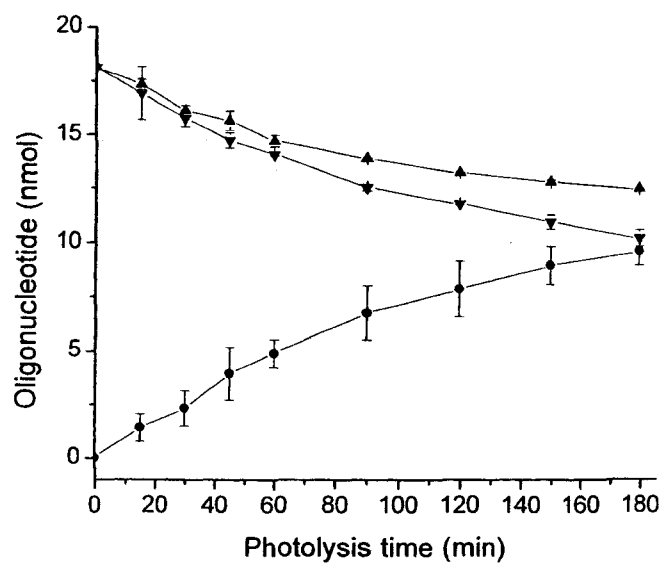


**Figure 3 (Bergeron et al.)**

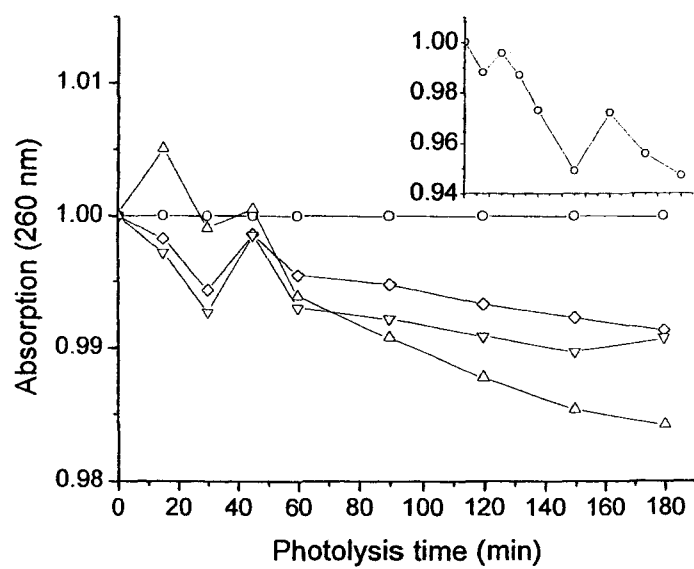


**Figure 4 (Bergeron et al.)**

a)



b)



**Chart 1. MQ-conjugated and complementary strands.**

Sequences I-IV:

MQ-conjugated strand: 5'-GCG ATA CCA TAC CAT AXA TAC CAT ACC ATA  
GCG-3' Complementary strand: 3'-CGC TAT GGT ATG GTA TYT ATG GTA TGG  
TAT CGC-5'

where X=MQ and Y=A,T,C,G. GG doublets are numbered from 1-4 starting at the 5'-terminus

Sequence V:

MQ-conjugated strand: 5'-XA TAC CAT ACC ATA CCA TAC CAT ACC ATA GCG  
-3' Complementary strand: 3'-T ATG GTA TGG TAT GGT ATG GTA TGG TAT  
CGC-5'

where X=MQ. GG doublets are numbered from 1-5 starting at the 3'-terminus

**Table 1.** Yield of products from PAGE analysis<sup>a</sup>

|                      | A (I) | G(II)   | T(III) | C(IV) | 5'-MQ<br>(V) <sup>b</sup> |
|----------------------|-------|---------|--------|-------|---------------------------|
| Crosslinks (-P)      | 12.30 | 4.56    | 6.50   | 13.68 | 5.50                      |
| Crosslinks (+P)      | 4.98  | 2.76    | 4.98   | 7.74  | 3.04                      |
| T (3')               | 0.05  | 0.26    | 0.37   | 0.37  | ---                       |
| Base (A,G,T,C)       | 0.16  | 0.09    | 0.22   | 0.22  | ---                       |
| T (5')               | 0.05  | 0.03    | 0.06   | 0.06  | ---                       |
| Sub-total            | 0.27  | 0.37    | 0.66   | 0.65  | ---                       |
| GG <sub>3</sub> (3') | 0.05  | 0.01    | 0.07   | 0.04  | 0.42                      |
| GG <sub>3</sub> (5') | 0.11  | 0.03    | 0.04   | 0.04  | 1.91                      |
| GG <sub>4</sub> (3') | 0.03  | 0.01    | 0.02   | 0.03  | 0.01                      |
| GG <sub>4</sub> (5') | 0.02  | (0.004) | 0.02   | 0.03  | 0.18                      |
| Sub-total            | 0.21  | 0.05    | 0.15   | 0.13  | 2.52                      |

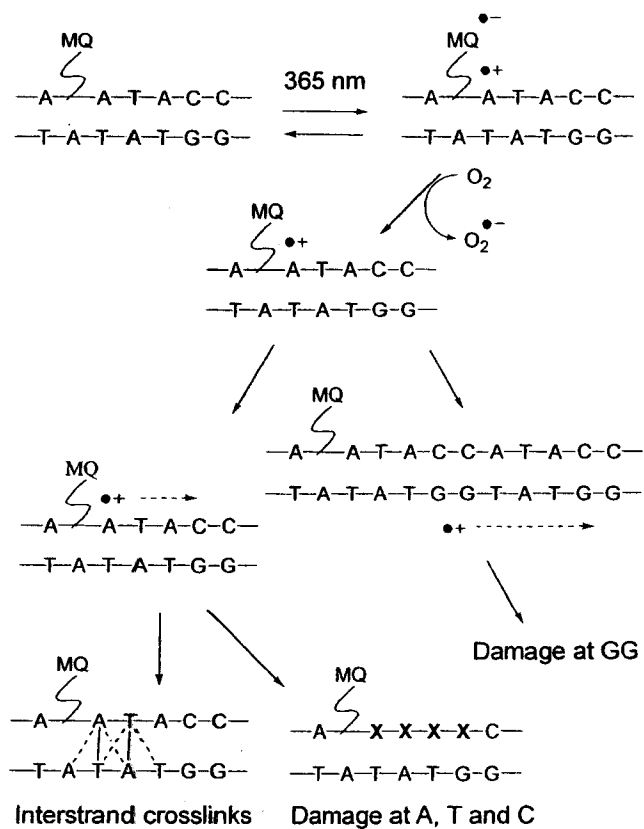
<sup>a</sup>The amount of damage was estimated by PAGE analysis (Figures 1 and 2). These values were converted into quantum yields ( $\times 10^4$ ) by assuming the same quantum yield of formation for crosslinks by PAGE analysis and HPLC-UV analysis. <sup>b</sup>Breaks in sequence V in which MQ is attached to the 5'-terminus occur at GG doublets closest to MQ (GG<sub>1</sub> and GG<sub>2</sub>, see *Chart 1*)



**Table 2.** Yield of DNA damage by HPLC-UV analysis

| DNA Damage        | Quantum yield ( $\times 10^4$ ) |
|-------------------|---------------------------------|
| GG-strand         | - 6.5                           |
| MQ-strand         | - 7.1                           |
| Crosslinks        | + 12.3                          |
| dCyd              | - 10.8                          |
| dGuo              | - 12.4                          |
| dThd              | - 14.5                          |
| dAdo              | - 15.9                          |
| Total nucleosides | - 53.6                          |

**Scheme 1.** Proposed mechanism of MQ-sensitized photooxidation of DNA



## REFERENCES

1. Schuster, G.B. and Ed. (2004) Topics in Current Chemistry Vol. 236 Long-Range Electron Transfer in DNA. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
2. Boon, E.M. and Barton, J.K. (2002) Charge transport in DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 320-329.
3. Yoo, J., Delaney, S., Stemp, E.D.A. and Barton, J.K. (2003) Rapid radical formation by DNA charge transport through sequences lacking intervening guanines. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 6640-6641.
4. Williams, T.T., Dohno, C., Stemp, E.D. and Barton, J.K. (2004) Effects of the photooxidant on DNA-mediated charge transport. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 8148-8158.
5. Giese, B. (2002) Long-distance electron transfer through DNA. *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 51-70.
6. Lewis, F.D., Letsinger, R.L. and Wasielewski, M.R. (2001) Dynamics of photoinduced charge transfer and hole transport in synthetic DNA hairpins. *Acc. Chem. Res.*, **34**, 159-170.
7. Bixon, M. and Jortner, J. (2001) Charge transport in DNA via thermally induced hopping. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 12556-12567.
8. Giese, B., Amaudrut, J., Kohler, A.K., Spormann, M. and Wessely, S. (2001) Direct observation of hole transfer through DNA by hopping between adenine bases and by tunnelling. *Nature*, **412**, 318-320.
9. Bixon, M., Giese, B., Wessely, S., Langenbacher, T., Michel-Beyerle, M.E. and Jortner, J. (1999) Long-range charge hopping in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 11713-11716.
10. Schuster, G.B. (2000) Long-range charge transfer in DNA: Transient structural distortions control the distance dependence. *Acc. Chem. Res.*, **33**, 253-260.
11. Liu, C.S., Hernandez, R. and Schuster, G.B. (2004) Mechanism for radical cation transport in duplex DNA oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 2877-2884.

12. Barnett, R.N., Cleveland, C.L., Joy, A., Landman, U. and Schuster, G.B. (2001) Charge migration in DNA: Ion-gated transport. *Science*, **294**, 567-571.
13. Liu, C.S. and Schuster, G.B. (2003) Base sequence effects in radical cation migration in duplex DNA: Support for the polaron-like hopping model. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 6098-6102.
14. Melvin, T., Cunniffe, S.M.T., O'Neill, P., Parker, A.W. and Roldanarjona, T. (1998) Guanine is the target for direct ionisation damage in DNA, as detected using excision enzymes. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4935-4942.
15. Boone, E. and Schuster, G.B. (2002) Long-range oxidative damage in duplex DNA: the effect of bulged G in a G-C tract and tandem G/A mispairs. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 830-837.
16. Kan, Y. Z. and Schuster, G.B. (1999) Long-range guanine damage in single-stranded DNA: Charge transport through a duplex bridge and in a single-stranded overhang. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 10857-10864.
17. Spassky, A. and Angelov, D. (2002) Temperature-dependence of UV laser one-electron oxidative guanine modifications as a probe of local stacking fluctuations and conformational transitions. *J. Mol. Biol.*, **323**, 9-15.
18. Fisher, G.J. and Land, E.J. (1983) Photosensitization of pyrimidines by 2-methylnaphthoquinone in water: a laser flash photolysis study. *Photochem. Photobiol.*, **37**, 27-32.
19. Decarroz, C., Wagner, J.R., van Lier, J.E., Krishna, C.M., Riesz, P. and Cadet, J. (1986) Sensitized photo-oxidation of thymidine by 2-methyl-1,4-naphthoquinone. Characterization of the stable photoproducts. *Int. J. Radiat. Biol.*, **50**, 491-505.
20. Decarroz, C., Wagner, J.R. and Cadet, J. (1987) Specific deprotonation reactions of the pyrimidine radical cation resulting from the menadione mediated photosensitization of 2'-deoxycytidine. *Free Rad. Res. Commun.*, **2**, 295-301.
21. Krishna, C.M., Decarroz, C., Wagner, J.R., Cadet, J. and Riesz, P. (1987) Menadione sensitized photooxidation of nucleic acid and protein constituents. An ESR and spin-trapping study. *Photochem. Photobiol.*, **46**, 175-182.

22. Wagner, J.R. , van Lier, J.E. and Johnston, L.J. (1990) Quinone sensitized electron transfer photooxidation of nucleic acids: chemistry of thymine and thymidine radical cations in aqueous solution. *Photochem. Photobiol.*, **52**, 333-343.
23. Wagner, J.R. , van Lier, J.E., Decarroz, C., Berger, M. and Cadet, J. (1990) Photodynamic methods for oxy radical-induced DNA damage. *Methods Enzymol.*, **186**, 502-511.
24. Wagner, J.R. , Hu, C.C. and Ames, B.N. (1992) Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 3380-3384.
25. Wagner, J.R. , van Lier, J.E., Berger, M. and Cadet, J. (1994) Thymidine hydroperoxides - structural assignment, conformational features, and thermal decomposition in water. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 2235-2242.
26. Bienvenu, C. , Wagner, J.R. and Cadet, J. (1996) Photosensitized oxidation of 5-methyl-2'-deoxycytidine by 2-methyl-1,4-naphthoquinone: Characterization of 5-(hydroperoxymethyl)-2'-deoxycytidine and stable methyl group oxidation products. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 11406-11411.
27. Wagner, J.R., Decarroz, C., Berger, M. and Cadet, J. (1999) Hydroxyl-radical-induced decomposition of 2'-deoxycytidine in aerated aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4101-4110.
28. Futamura, S. and Zong, Z.M. (1992) Photobromination of side-chain methyl groups on arenes with N-bromosuccinimide. Convenient and selective synthesis of bis(bromomethyl)-and (bromomethyl)methylarenes. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **65**, 345-348.
29. Lin, T.S., Antonini, I., Cosby, L.A. and Sartorelli, A.C. (1984) 2,3-dimethyl-1,4-naphthoquinone derivatives as bioreductive alkylating agents with cross-linking potential. *J. Med. Chem.*, **27**, 813-815.
30. Oswald, B., Patsenker, L., Duschl, J., Szmecinski, H., Wolfbeis, O.S. and Terpetschnig, E. (1999) Synthesis, spectral properties, and detection limits of reactive squaraine dyes, a new class of diode laser compatible fluorescent protein labels. *Bioconjugate Chem.*, **10**, 925-931.
31. Agarwal, S. (1994) *Protocols for oligonucleotide conjugates.*, 108.

32. Ly, D., Sanii, L. and Schuster, G.B. (1999) Mechanism of charge transport in DNA: Internally-linked anthraquinone conjugates support phonon-assisted polaron hopping. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9400-9410.
33. Bergeron, F., Klarskov, K., Hunting, D.H. and Wagner, J.R. Photosensitized electron transfer in DNA containing 2-methyl-1,4-naphthoquinone: Formation of adenine-adenine interstrand crosslinks. *Submitted*, 2004.
34. Liu, Z.J., Gao, Y. and Wang, Y.S. (2003) Identification and characterization of a novel cross-link lesion in d(CpC) upon 365-nm irradiation in the presence of 2-methyl-1,4-naphthoquinone. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 5413-5424.
35. Bellon, S., Ravanat, J. L., Gasparutto, D. and Cadet, J. (2002) Cross-linked thymine-purine base tandem lesions: Synthesis, characterization, and measurement in gamma-irradiated isolated DNA. *Chem. Res. Toxicol.*, **15**, 598-606.
36. Chatgililoglu, C., Guerra, M. and Mulazzani, Q.G. (2003) Model studies of DNA C5' radicals. Selective generation and reactivity of 2'-deoxyadenosin-5'-yl radical. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3839-3848.
37. Lentzen, O., Constant, J.F., Defrancq, E., Prevost, M., Schumm, S., Moucheron, C., Dumy, P. and Kirsch-De Mesmaeker, A. (2003) Photocrosslinking in ruthenium-labelled duplex oligonucleotides. *Chembiochem.*, **4**, 195-202.
38. Melvin, T., Bothe, E. and Schultefrohlinde, D. (1996) The reaction of triplet 2-methyl-1,4-naphthoquinone (menadione) with DNA and polynucleotides. *Photochem. Photobiol.*, **64**, 769-776.
39. Hall, D.B., Holmlin, R.E. and Barton, J.K. (1996) Oxidative DNA damage through long-range electron transfer. *Nature*, **382**, 731-735.
40. Cook, G.P., Chen, T., Koppisch, A.T. and Greenberg, M.M. (1999) The effect of secondary structure and O<sub>2</sub> on the formation of direct strand break upon UV irradiation of 5-bromodeoxyuridine-containing oligonucleotides. *Chemistry & Biology*, **6**, 451-459.
41. Wan CZ, Fiebig T, Schiemann O, Barton JK and Zewail AH (2000) Femtosecond direct observation of charge transfer between bases in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 14052-14055.

42. Kelle y, S.O. and Barton, J.K. (1999) Electron transfer between bases in double helical DNA. *Science*, **283**, 375-381.
43. Sanii, L. and Schuster, G.B. (2000) Long-distance charge transport in DNA: Sequence-dependent radical cation injection efficiency. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11545-11546.
44. Weinfeld, M. and Soderlind, K.J. (1991) <sup>32</sup>P-Postlabeling detection of radiation-induced DNA damage: Identification and estimation of thymine glycols and phosphoglycolate termini. *Biochemistry*, **30**, 1091-1097.
45. Wang, Y.S. HP LC isolation and mass spectrometric characterization of two isomers of thymine glycols in oligodeoxynucleotides. *Chem. Res. Toxicol.*, **15**, 671-676.
46. Cullis, P.M. , Malone, M.E. and Mersondavies, L.A. (1996) Guanine radical cations are precursors of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine but are not precursors of immediate strand breaks in DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2775-2781.
47. O'N eill, P., Parker, A.W., Plumb, M.A. and Siebbeles, L.D.A. (2001) Guanine modifications following ionization of DNA occurs predominantly via intra- and not interstrand charge migration: An experimental and theoretical study. *J. Phys. Chem. B*, **105**, 5283-5290.
48. Douki, T., Ang elov, D. and Cadet, J. (2001) UV laser photolysis of DNA: Effect of duplex stability on charge-transfer efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* , **123**, 11360-11366.
49. Douki, T. and Cadet, J. (1999) Modification of DNA bases by photosensitized one-electron oxidation. *Int. J. Radiat. Biol.*, **75**, 571-581

### **Chapitre III : article 2**

*J. Am. Chem. Soc.* 128, 14798-14799 (2006).



## Near-UV induced Interstrand Cross-links in Anthraquinone-DNA Duplexes

François Bergeron, Vandana K. Nair, J. Richard Wagner\*

Group in the Radiation Sciences, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé,

Université de Sherbrooke, QC, Canada J1H 5N4

RECEIVED DATE (automatically inserted by publisher); Richard.Wagner@USherbrooke.ca

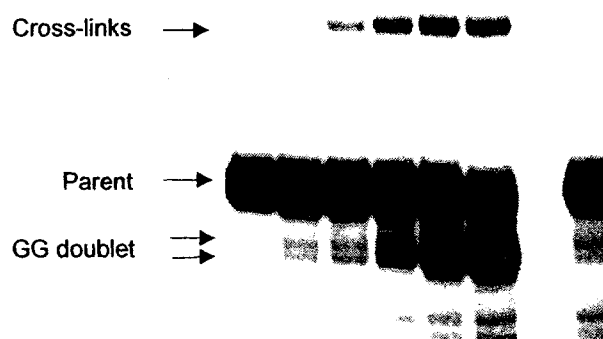
The ability of DNA to facilitate charge transfer has largely been examined using photosensitizers to generate base radical cations at specific sites in oligonucleotides.<sup>1</sup> In particular, anthraquinone (AQ) has been extensively used as a photosensitizer to study charge transfer in DNA.<sup>2</sup> Despite the complexity of these model systems, the bulk of evidence supporting charge transfer in DNA is based on the formation of alkaline labile strand breaks at GG doublets and other sites of low oxidation potential.<sup>3</sup> In contrast, there is a serious lack of information about the exact structure of damage in photochemical systems. Recently, we showed that 2-methyl-1,4-naphthoquinone (menadione) tethered DNA induced a variety of damage, including alkaline labile breaks, interstrand cross-links, and damage at all four DNA bases.<sup>4</sup> These and other examples<sup>5</sup> demonstrate the surprising reactivity of base radicals imbedded in DNA duplexes. Here, we report the formation of novel interstrand cross-links between AQ and thymine in DNA.

## Chart 1. Sequences of AQ-ODN duplexes

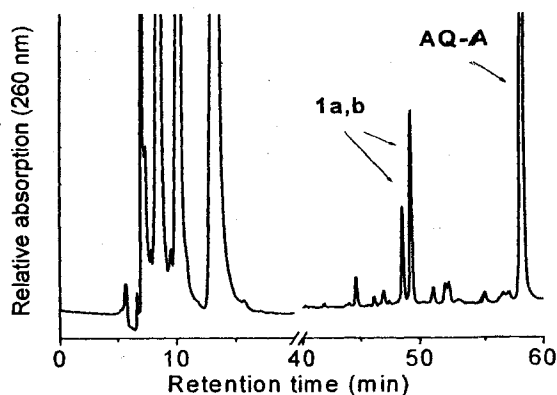
1: 5'-XATACCATACCATACCATACCATAGCG  
2: 3'-TATGGTATGGTATGGTATGGTATCGC

3: 5'-GCGATACCATACCATAXATACCATACCATAGCG  
4: 3'-CGCTATGGTATGGTATATATGGTATGGTATCGC  
5: 3'-..... UAT.....  
6: 3'-..... TAU.....  
X=AQ-amino linker (see structure, Chart 2).

Anthraquinone (AQ) tethered oligonucleotides (ODN) were prepared by conjugation of AQ succinyl-ester with ODN containing an amino linker (see supporting information). Near-UV photolysis of AQ-ODN duplexes led to the formation of novel products that migrated slower than the parent strand on denaturing gel electrophoresis (Fig. 1). Hydrolysis of irradiated AQ-ODN duplexes with P1 nuclease and alkaline phosphatase depicted the four early-eluting non-modified nucleosides of DNA followed by several late-eluting peaks (Fig. 2). The peak at 58 min, which was the only late-eluting peak observed in non-irradiated samples, may be attributed to AQ linker attached to non-modified A (AQ-A;  $m/z$  739 ( $M+2Na^+$ )). AQ-A was also observed upon digestion of both ODN1 and ODN3, and thus, the residue on the 3'-side of AQ was not susceptible to hydrolysis by P1 nuclease. This agrees with the sequence specificity of P1 nuclease toward certain base damage.<sup>6</sup> In contrast, AQ-A was completely hydrolyzed to AQ linker ( $m/z$  404 ( $M+Na^+$ )) and non-modified A when treated with snake venom phosphodiesterase.



**Figure 1.** Analysis of DNA damage by PAGE. Near-UV photolysis of ODN1/2 duplex in O<sub>2</sub>. Left to right: dark control, 15, 30, 60, 120, 180 min of photolysis, and G+A sequence ladder. All samples were treated with hot piperidine before analysis.

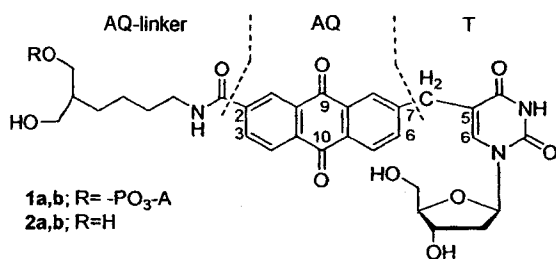


**Figure 2.** Analysis of DNA damage by HPLC. ODN3/4 duplex was irradiated in O<sub>2</sub> for 60 min and enzymatically digested to its components with P1 nuclease and alkaline phosphatase.

Two major photoproducts were observed by HPLC analysis of irradiated AQ-ODN duplexes (1a,b; Fig. 2; Chart 2). These products gave the same molecular ions ( $m/z$  979 ( $M+2Na^+$ )), which included the mass of AQ-A ( $m/z$  739) plus T ( $m/z$  242) minus two H-atoms. Upon treatment with phosphodiesterase, 1a,b converted quantitatively to two fragments (2a,b) with a longer retention time on HPLC (~54 min) and a lighter molecular ion ( $m/z$  644 ( $M+Na^+$ ); Figs. S1,S2). In addition, hydrolysis of 1a,b led to the release of non-modified dAdo as observed by HPLC. Thus, T is

linked to AQ in the structure of cross-links (**1a,b** and **2a,b**). Furthermore, attachment of T and AQ appears to involve a single bond (i.e., leads to the loss of two H-atoms) and does not significantly affect UV absorption (i.e., 260/340 is equal to 10 for **1a,b**, 9 for **2a,b**, and 11 for AQ-A. The position of the cross-link on T was deduced by examining the effect of replacing T for U in alternative AQ-DNA duplexes (Chart 1: ODN3/5 and ODN3/6). The presence of U on the reactive 3'-side of the complementary strand (ODN5) completely blocked the formation of **1a,b** with no indication of cross-links involving U. In addition, the possibility that T was attached to AQ via an exchangeable proton, i.e., the N3 position of T, was ruled by MS analysis of H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O labeled compounds (Figs. S1-S4). The above results indicate that the cross-link between T and AQ occurs via the methyl group of T. Lastly, the position of attachment of T to AQ was investigated by <sup>1</sup>H-NMR analysis. The spectrum of **2b** showed a similar splitting pattern for the two aromatic ring systems which is consistent with attachment of T at either C6 or C7 of AQ but not with attachment of T at other positions (C1, C3, C4, C5, C8; Fig. S5). Thus, the structure of **2b** is limited to two possibilities in which T is attached to AQ via the methyl group of T and either C6 or C7 of AQ.

Chart 2. Proposed structure of AQ-T cross-links (**1,2**).



Cross-links were observed for both end and centrally tethered AQ-ODN duplexes (Table 1). Upon treatment with hot piperidine, at least half of the cross-links collapsed to fragments with the same mobility as parent strands. The formation of piperidine resistant cross-links (CL(+P)) was comparable to the formation of **1a,b**, suggesting that CL(+P) consists mainly of **1a,b**. The formation of cross-links depended on the presence of O<sub>2</sub>. Although the effect of O<sub>2</sub> on total cross-links was small and variable, there was a clear inhibitory effect toward the formation of both CL(+P) and **1a,b** (Table 1). Interestingly, the formation of breaks at GG doublets was only observed in the presence of O<sub>2</sub> and only in the case of the end-tethered AQ-ODN duplex.

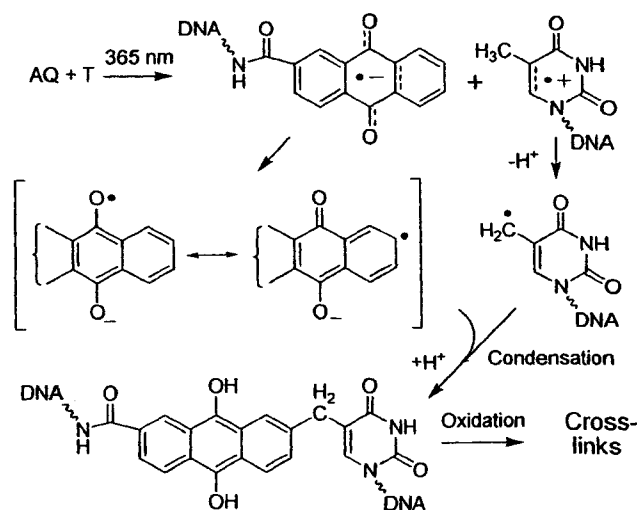
Table 1. Formation of damage and consumption of AQ-A<sup>a</sup>

|                        | CL(-P) | CL(+P) | GG(+P) | AQ-A | <b>1a,b</b> |
|------------------------|--------|--------|--------|------|-------------|
| ODN1/2 -N <sub>2</sub> | 2.8    | 1.4    | n.d.   | 3.6  | 1.3         |
| ODN1/2 -O <sub>2</sub> | 2.5    | 0.9    | 22.8   | 4.0  | 0.4         |
| ODN3/4 -N <sub>2</sub> | 3.7    | 1.4    | n.d.   | 3.5  | 1.1         |
| ODN3/4 -O <sub>2</sub> | 2.8    | 0.9    | <0.5   | 2.7  | 0.5         |

<sup>a</sup>Fraction of initial substrate per second ( $\times 10^{-3}$ ). Cross-links (CL) and strand breaks at GG doublets were estimated by PAGE (Fig. 1). (-P)-untreated; (+P)-treated with piperidine for 30 min at 90°C. AQ-A and CL was estimated by HPLC analysis (Fig. 2). Rates calculated by linear regression of the data ( $n=5$ , SD  $\leq 10\%$ ). n.d.; not detected.

The mechanism of formation of cross-links likely involves initial charge transfer from T to excited AQ giving T radical cations and AQ radical anions (Scheme 1). In view of the relatively low quantum yield of damage ( $10^{-3}$ - $10^{-5}$ ), the majority

of radical ions undergo back transfer to T and AQ.<sup>2b,4</sup> At this point, we propose a deviation from the generally accepted mechanism involving the transport of electron holes and eventual damage at GG doublets. We propose that T radical cations partially undergo deprotonation to T methyl radicals. This is a major pathway for the radical cations of T and 5-methylcytosine.<sup>7</sup> Recently, the same reactions were implicated in the formation of breaks in certain AQ- and menadione-DNA duplexes.<sup>8</sup> Thus, it is reasonable to propose that T methyl radicals in AQ-DNA duplexes react with AQ semi-quinone radical anions to give cross-links. The resulting hydroquinone then undergoes oxidation to the quinone as the stable product. The formation of isomers (a and b) is explained by condensation of AQ radicals at different radical sites (C6 or C7). Lastly, the inhibitory action of O<sub>2</sub> suggests that O<sub>2</sub> reacts with either AQ radicals (to give AQ) or with T methyl radicals (to give T peroxy radicals), diverting the pathway to other damage.



Scheme 1. Proposed mechanism of formation of cross-links.

In summary, we report the formation of novel interstrand cross-links in AQ-ODN duplexes. This damage is comparable in yield to damage at GG doublets, depending on the site of attachment and the reaction conditions.

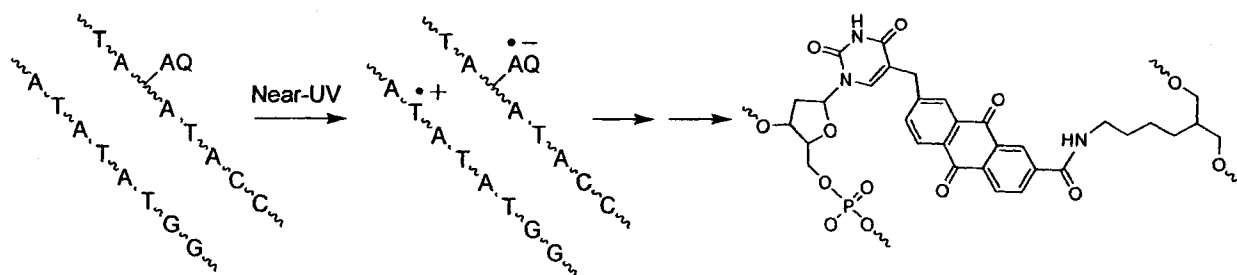
**Acknowledgments.** This work was supported by a grant from NSERC (to JRW). We are grateful to Pr. Klaus Klarskov for MS analysis. VKN is thankful to Mahatma Gandhi University, Kerala, India, for sanctioning leave for this project.

**Supporting Information.** Experimental details; MALDI-TOF of ODN1-4; ESI-MS/MS of **2a,b**; and <sup>1</sup>H-NMR of **2b**.

## References

- Schuster, G. B. *Long-Range Electron Transfer in DNA*, Topics in Current Chemistry, Vol. 236; Springer-Verlag: Germany, 2004.
- a) Liu, C. S.; Hernandez, R.; Schuster, G. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2877-2884. b) Williams, T. T.; Dohno, C.; Stemp, E. D.; Barton, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8148-8158.
- a) Burrows, C. J.; Muller, J. G. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1151. b) Cadet, J.; Bellon, S.; Berger, M.; Bourdat, A. G.; Douki, T.; Duarte, V.; Frelon, S.; Gasparutto, D.; Muller, E.; Ravanat, J. L.; Sauvaigo, S. *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 933-943.
- Bergeron, F.; Houde, D.; Hunting, D. J.; Wagner, J. R. *Nucleic Acids. Res.* **2004**, *32*, 6154-6163.
- a) Hong, I. S.; Ding, H.; Greenberg, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 485-491. b) Zeng, Y.; Wang, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6552-6553.

- (6) Weinfeld, M.; Soderlind, K.J. *Biochemistry* **1991**, *30*, 1091-1097.
- (7) a) Decarroz, C.; Wagner, J.R.; van Lier, J.E.; Krishna, C.M.; Riesz, P.; Cadet, J. *Int. J. Radiat. Biol.*, **1986**, *50*, 491-505. b) Biennu, C.; Wagner, J. R.; Cadet, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11406-11411.
- (8) a) Joy, A.; Ghosh, A. K.; Schuster, G. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5346-5347. b) Yamada, H.; Tanabe, K.; Nishimoto, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 665-668.



Anthraquinone (AQ) has been extensively used as a photosensitizer to study charge transfer in DNA. Near-UV photolysis of AQ induces electron abstraction in oligonucleotides leading to AQ radical anions and base radical cations. In general, this reaction is followed by the transport of base radical cations to sites of low oxidation potential, i.e., GG, and conversion of G radical cations to DNA breaks. Here, we show that AQ also produces interstrand cross-links in DNA duplexes. About half of the cross-links collapse to single strands in hot piperidine treatment. The structure of the stable interstrand crosslinks was deduced by MS, NMR, and sequence substitution. The cross-links consist of a covalent link between the methyl group of T on one strand with either C6 or C7 of AQ on the other strand. The formation of interstrand cross-links decreased in O<sub>2</sub> compared to deoxygenated solutions. In the presence of O<sub>2</sub>, the yield of breaks at GG doublets was 10-fold greater than that of cross-links for end tethered AQ while cross-links exceeded breaks for centrally located AQ. The formation of stable cross-links can be explained by initial charge transfer from T to excited AQ, deprotonation of T radical cations, and condensation of the latter species with AQ radicals. These studies reveal a novel pathway of damage in the photolysis of AQ-DNA duplexes.

## SUPPORTING INFORMATION

Near-UV induced Interstrand Cross-links in Anthraquinone-DNA Duplexes by François Bergeron, Vandana K. Nair, and J. Richard Wagner.

**General Methods.** Chemical reagents were obtained from Aldrich unless otherwise stated. T4 polynucleotide kinase and phosphodiesterase I were obtained from USB Corporation and [ $\gamma$ - $^{32}$ ATP] was purchased from Perkin Elmer Life Sciences. Nuclease P1 and alkaline phosphatase were purchased from Sigma and Roche, respectively. Oligonucleotides were provided by AlphaDNA (Montreal) and their mass verified by MALDI-TOF (Table S1). Uni-link AminoModifier phosphoramidite was obtained from Clontech and incorporated into either terminal or internal positions during oligonucleotide synthesis. HPLC-UV analysis was carried out on Alliance systems (Waters 2795 or 2690) connected to dual wavelength UV detectors (Waters 2487) and a Millenium workstation (Waters version 4).  $^1\text{H}$ -NMR spectra were recorded using Bruker 300 MHz and 600 MHz Varian spectrometers. MS analyses were performed on Micromass ToF Spec 2E (MALDI-TOF) and Q-ToF 2 (ESI-MS/MS) spectrometers.

**Anthraquinone-2-carboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester (AQ-NHS ester).** The carboxylic acid derivative (86 mg, 0.34 mmol) was dissolved in 15 mL anhydrous N,N-dimethylformamide (DMF), followed by the addition of dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 210 mg, 1 mmol) and N-hydroxysuccinimide (NHS, 117 mg, 1 mmol). The mixture was stirred overnight under argon and filtered. The filtrate was lyophilized, dissolved in 15 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , filtered again and evaporated to dryness. The product was then purified by flash chromatography using 30% ethyl acetate in hexane ( $R_f$  = 0.23). Yield 50 mg (42%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  2.1 (s, 4H, succinimide), 8.0 (m, 2H,  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_7$ ), 8.2 (m, 2H,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_8$ ), 8.4 (d, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.5 (d, 1H,  $\text{H}_3$ ).

**Conjugation of AQ-NHS ester with oligonucleotides.** The coupling reaction was carried out by mixing a solution of purified oligonucleotides containing amino modifier (200  $\mu\text{g}$ , 19.7 nmol) in 200  $\mu\text{L}$  of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 mM buffer (pH 7.5) with a solution of AQ-NHS ester (0.5 mg, 1.4  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (200  $\mu\text{L}$ ).

The reaction was complete after 6 h at 37°C as monitored by HPLC with dual wavelength detection at 260 and 340 nm (Yield > 90%).

**Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) analysis.** Gel purified oligonucleotides were labeled at the 5' end with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>ATP] using T4 polynucleotide kinase according to the standard procedure. Labeled DNA was immediately purified on a Sephadex resin microcolumn and collected in 10 mM NaHPO<sub>4</sub> buffer (pH 7.0). Unlabeled AQ-conjugated and <sup>32</sup>P-labeled complementary strands were subsequently hybridized by heating equal molar solutions in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) for 5 min at 65°C in a water bath and then allowing the mixture to cool to 30°C (1 h). The extent of hybridization was 100% as indicated by non-denaturing gel electrophoresis (10% 19:1 acrylamide/bis-acrylamide). For PAGE analysis, AQ-ODN duplexes (4  $\mu$ M, 200  $\mu$ L) were exposed to near-UV photolysis and aliquots (7  $\mu$ L) were collected at 0, 15, 30, 60, 120, 180 min. The aliquots were divided into two equal parts for the analysis of DNA breaks, before and after treatment with piperidine (1 M piperidine, 90°C, 30 min). Samples were evaporated to dryness in a vacuum concentrator and suspended in denaturing loading buffer, heated to 80°C for 10 min, quenched on ice and then subjected to PAGE analysis on a 20% 19:1 acrylamide/bis-acrylamide denaturing gel (7 M urea). The gels were exposed overnight on a phosphor screen cassette and scanned using a Storm phosphorimager and Imagequant software (Molecular Dynamics).

**HPLC analysis.** AQ-ODN duplexes were prepared as above for PAGE analysis. For HPLC analysis, AQ-ODN duplexes (25  $\mu$ M; 200  $\mu$ L; 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0) were exposed to near-UV light (365 nm) and aliquots were collected at 0, 45, 90, 135 and 180 min. Analysis were performed on intact and fully digested oligonucleotides. The analysis of intact oligonucleotides was carried out on a reversed phase column (3 $\mu$  ODS-AQ 150 x 6 mm; YMC) using a gradient starting at 92% solvent A and 8% solvent B for 5 min and going to 72% solvent A and 28% Solvent B in the next 20 min, where solvent A is composed of 25 mM triethylammonium acetate (TEAA; pH = 7.0 – 2.5% acetonitrile) and solvent B is composed of 95% acetonitrile – 5% water. The flow rate was 1 ml/min and the column was

maintained at a temperature of 60°C. The analysis of digested oligonucleotides containing cross-links was carried out by enzymatic digestion with P1 nuclease and alkaline phosphatase followed by HPLC separation of the mixture using a YMC 5 $\mu$  ODS-A column (250 x 4.6 mm) with a gradient starting at 95% solvent C (25 mM triethylammonium acetate, TEAA; pH = 5.5 – 2.5% acetonitrile) and 5% solvent B for 10 min and increasing acetonitrile from 5% to 36.5% in 55 min at a flow rate of 1 mL/min and 30°C. The eluant was monitored at 260 and 340 nm.

**Near-UV photolysis.** Photolysis was carried out with a 1000 W Hg-Xe arc lamp (Oriel Corp.) fitted with an infrared filter and monochromator set at 365  $\pm$  2 nm (Spectral Energy). The beam of light was focused on the face of a quartz cuvette (pathlength = 1 cm). Oxygenated solutions were bubbled with oxygen for 20 min before photolysis and during photolysis. Photolysis under deoxygenated conditions was achieved by degassing the solution with nitrogen bubbling in a glove box saturated with nitrogen. This operation was repeated at every time-point. The relative rates of formation of cross-links by PAGE were estimated by the growth of cross-links in terms of the fraction of total radioactivity ( $^{32}$ P-ODN2 or  $^{32}$ ODN4) as a function of time in seconds. Similarly, the rates of formation of cross-links by HPLC were estimated by their absorption at 340 nm, assuming that both cross-links (1a,b) and AQ-A have the same molar absorptivity.

**Comparison of experimental and simulated spectra of 2b.** Spectra were generated for structures containing T attached to one of the seven unsubstituted sites of the AQ ring (Fig. 5S). NMR spectra were simulated by ChemDraw Ultra 8.0. It should be noted that identical spectra were obtained for the simulation of structures with T at either C6 or C7 positions of AQ (likewise for structures with T at either C5 or C8 positions of AQ). In addition, the simulated spectra were aligned with the experimental spectrum with respect to the chemical shift of C1'-H (T) whose simulated chemical shift was offset by 0.15 ppm. The best match between experimental and simulated spectra was obtained for a structure with the T moiety at C7 (or C6) of the AQ ring (Fig. 5Sa compared to Fig. 5Sb). Both spectra depicted the same pattern of aromatic protons, which included three signals for the ring containing the linker

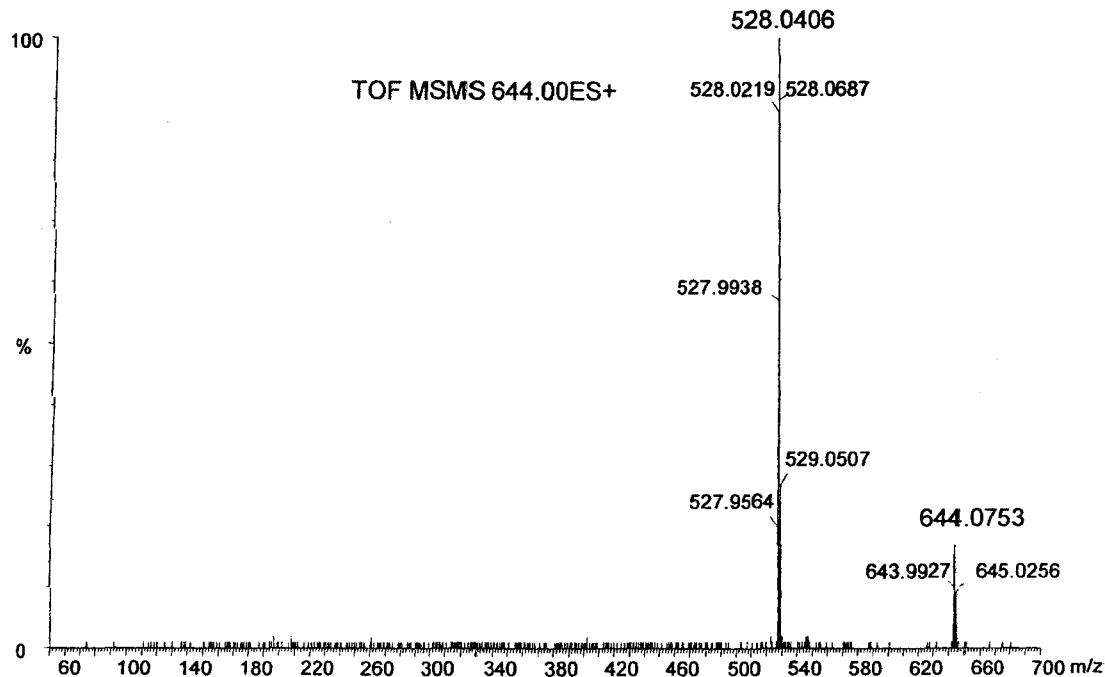
substituent and three signals for the ring containing the T substituent. Each spin system depicted two signals with moderate coupling, i.e., between ortho and meta protons, and one signal with minor coupling, i.e., between para protons of the ring. In contrast, simulated spectra of the other possible structures did not match the experimental spectrum. The spectrum for the structure with T attached to C8 (or C5) of the AQ ring was different than the experimental spectrum because of the presence of a pseudo triplet for the C6-H proton (**Fig. 5Sa** compared to **Fig. 5Sc**). On the other hand, the spectra for structures with linker and T moieties attached to the same ring gave a distinct pattern of aromatic peaks that was not observed in the experimental spectrum (**Fig. 5Sa** compared to **Fig. 5Sd-f**). In particular, the latter spectra showed multiple peaks at 7.8-7.9 ppm (C4-H, C5-H, and C8-H) and 7.5-7.6 ppm (C6-H and C7-H). Thus, we conclude that T is attached to either C6 or C7 in the structure of **2b**.

**Table S1. MALDI-TOF analyses of AQ-conjugated oligonucleotides.**

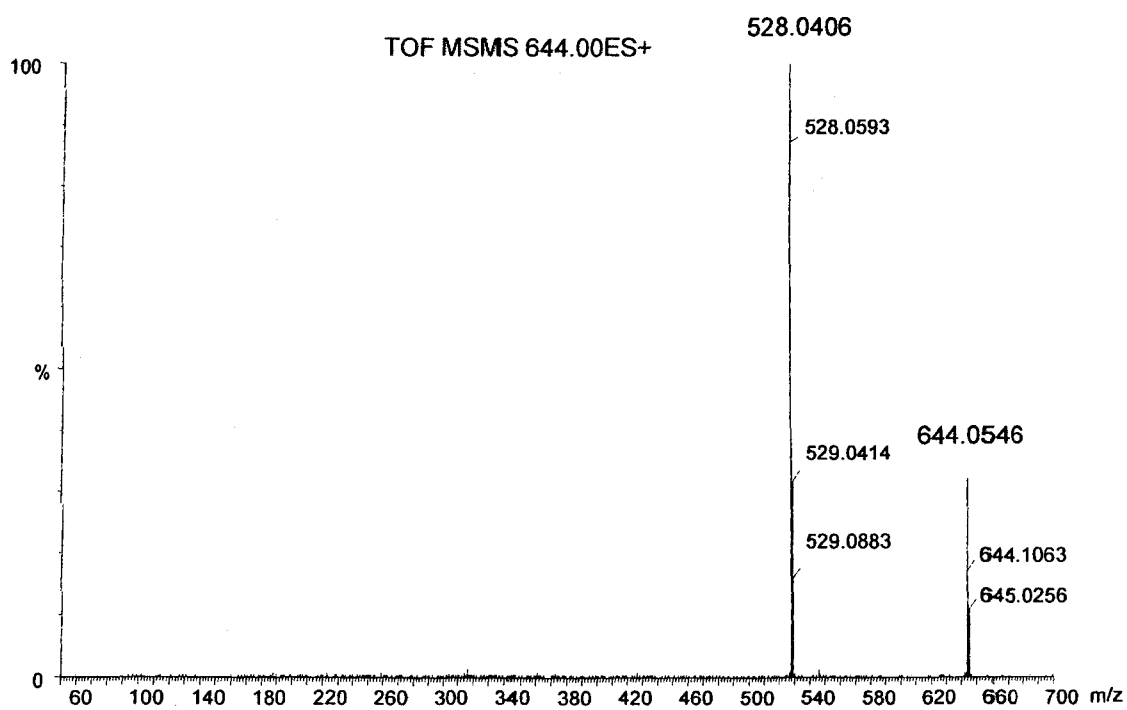
|      | measured | calculated |
|------|----------|------------|
| ODN1 | 9811.8   | 9806.5     |
| ODN2 | 9671.5   | 9667.3     |
| ODN3 | 10179.2  | 10175.8    |
| ODN4 | 10236.4  | 10229.7    |



**Figure S1: ESI-MS/MS of 2a in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN 1 mM NaCl**



**Figure S2: ESI-MS/MS of 2b in H<sub>2</sub>O/ CH<sub>3</sub>CN 1 mM NaCl**



**Figure S3: ESI-MS/MS of 2a in D<sub>2</sub>O/ CH<sub>3</sub>CN 1 mM NaCl**

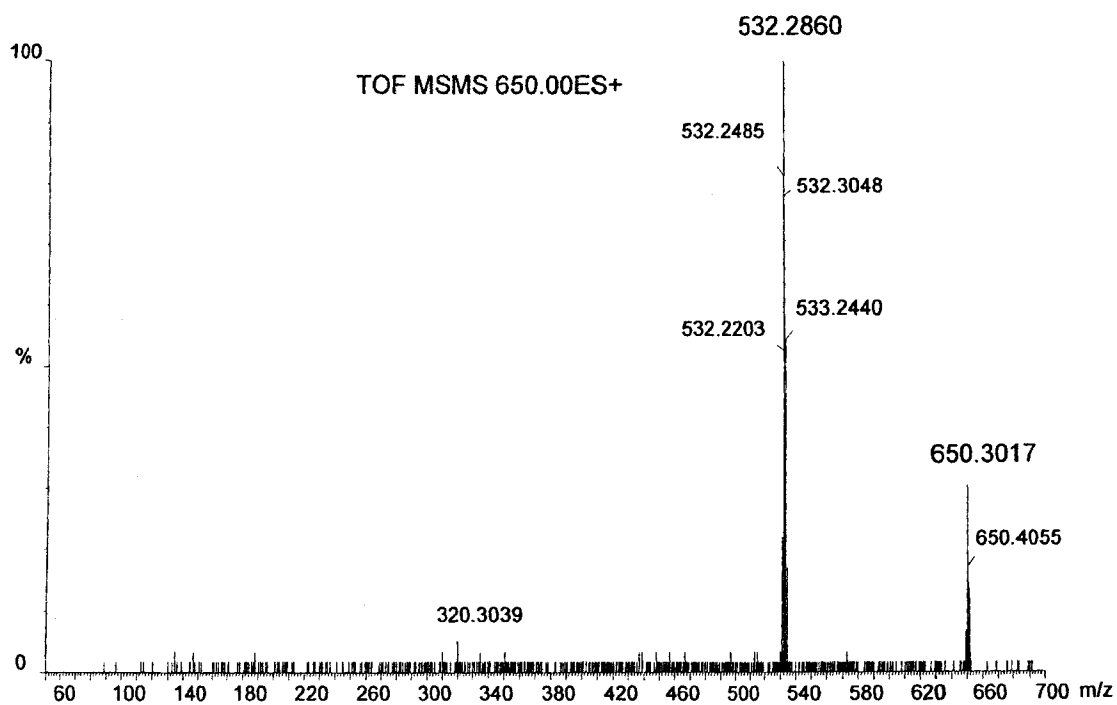


Figure S4: ESI-MS/MS of 2b in D<sub>2</sub>O/ CH<sub>3</sub>CN 1 mM NaCl

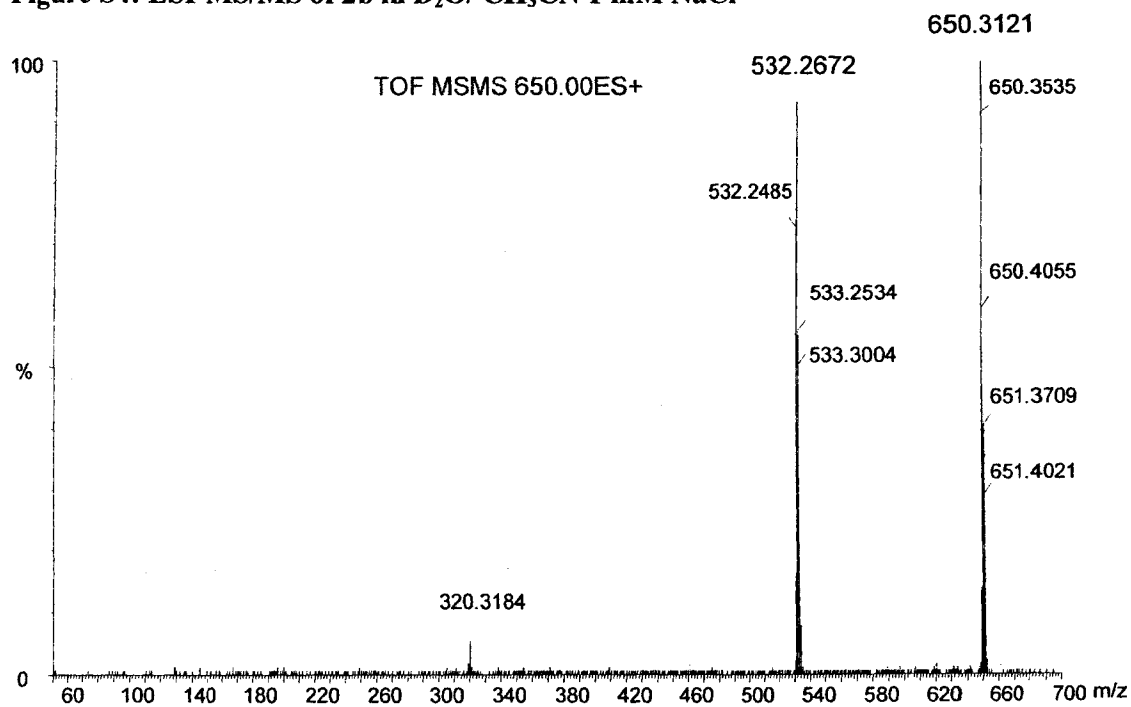
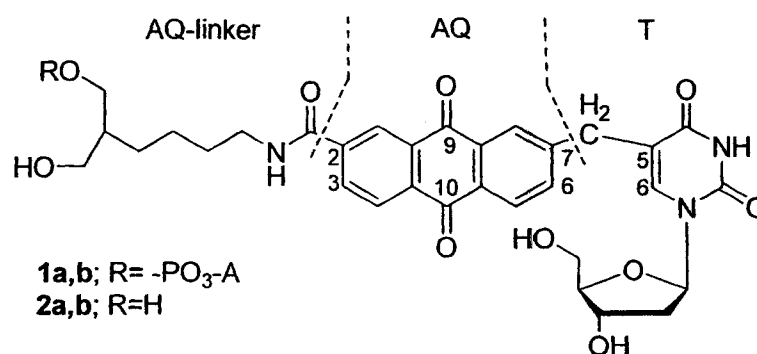
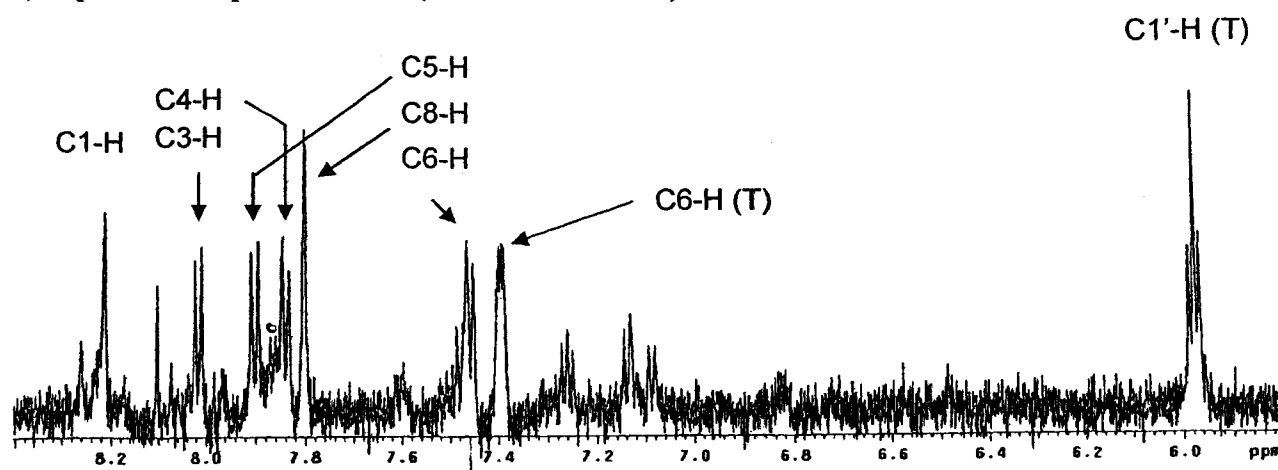


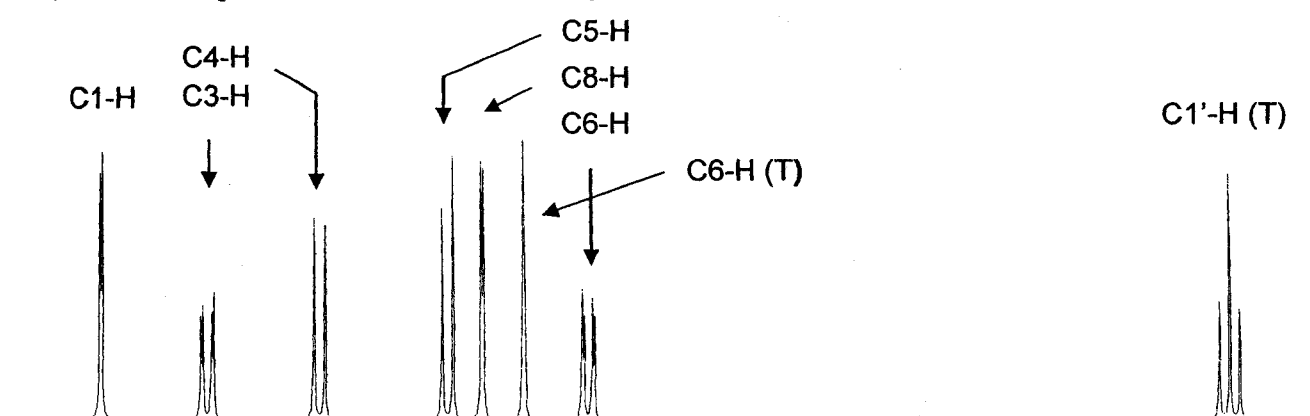
Figure 5S: Comparison of the experimental spectrum of 2b with simulated spectra.



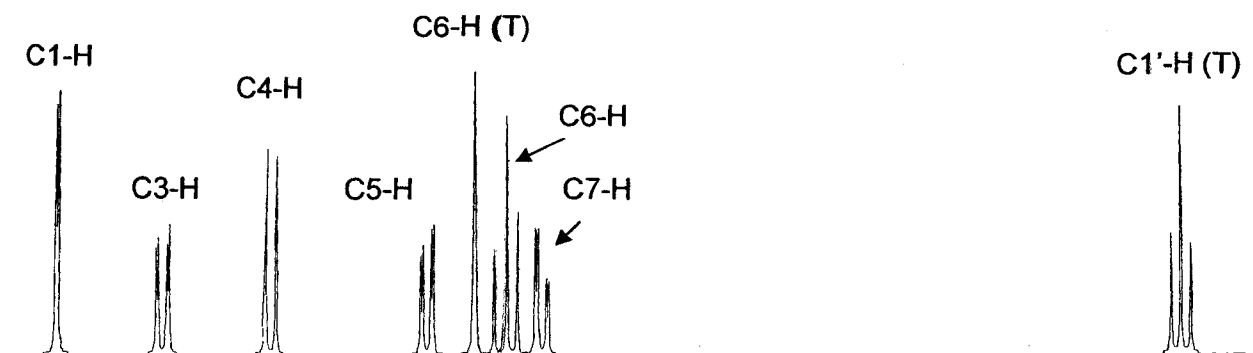
a) Experimental spectrum of 2b (<sup>1</sup>H-NMR -600 MHz)



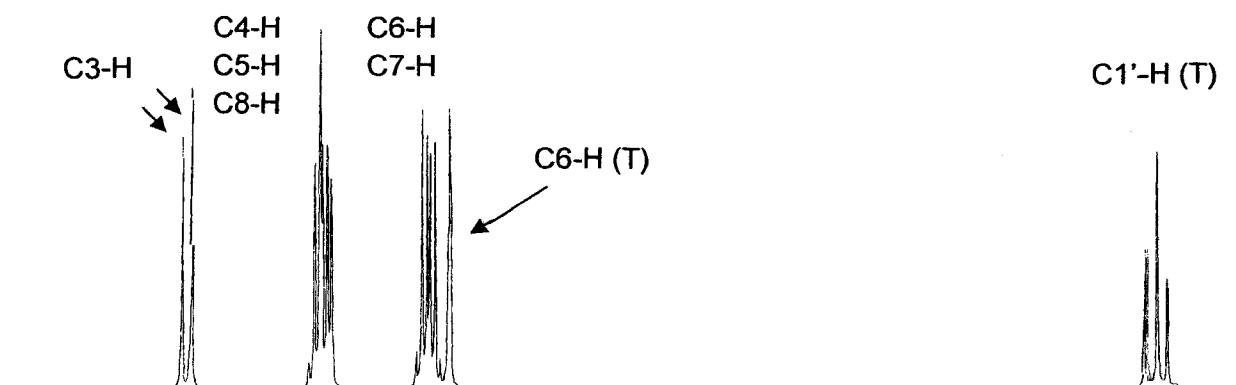
b) Simulated spectrum of structure with AQ-linker at C2 and T at C7



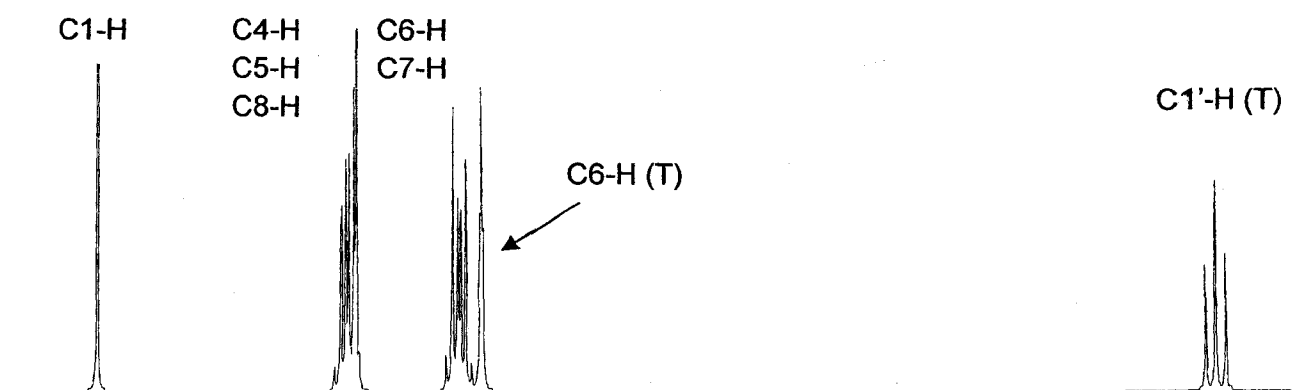
c) Simulated spectrum of structure with AQ-linker at C2 and T at C8



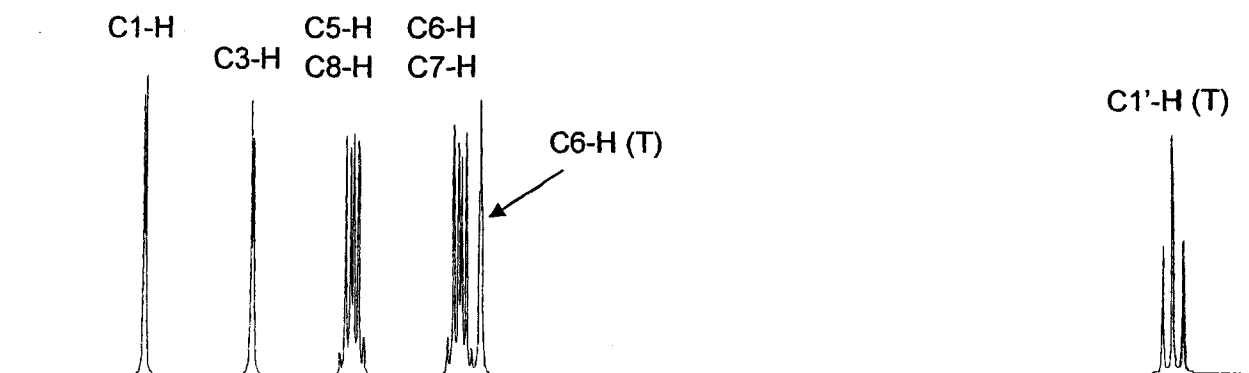
d) Simulated spectrum of structure with AQ-linker at C2 and T at C1



e) Simulated spectrum of structure with AQ-linker at C2 and T at C3



**f) Simulated spectrum of structure with AQ-linker at C2 and T at C4**



## **Chapitre IV : article 3**

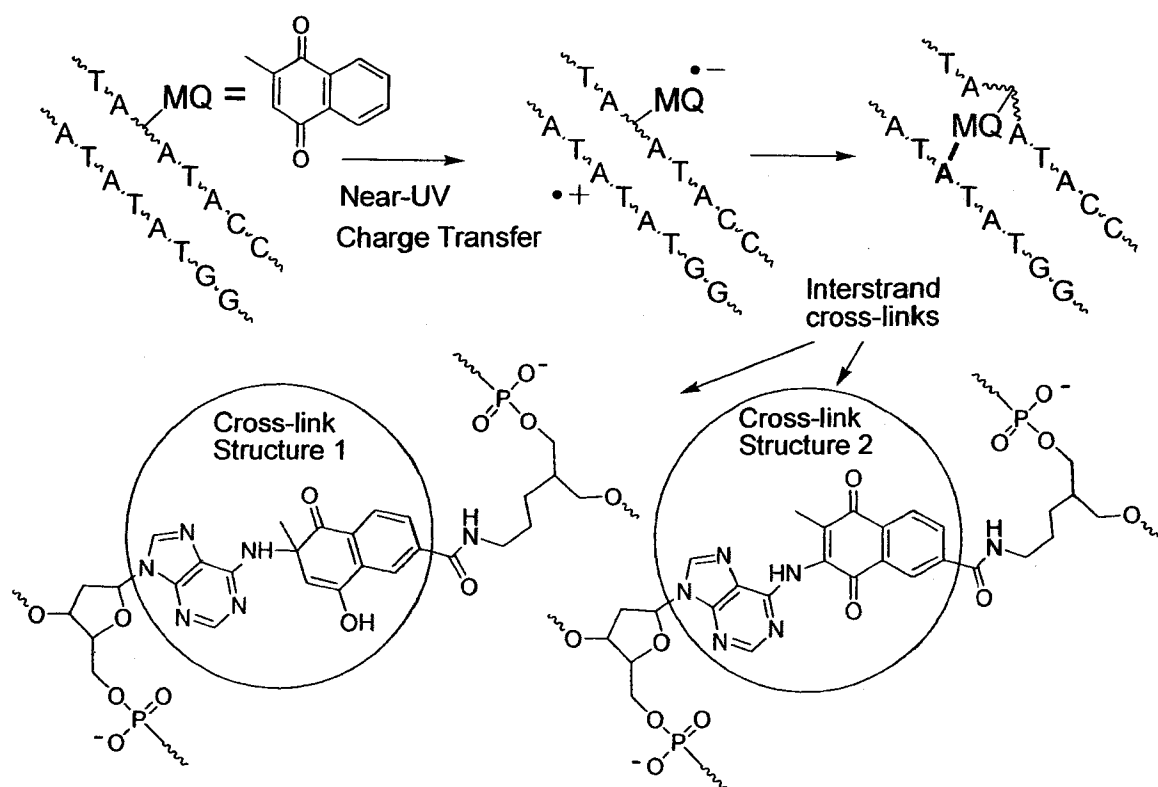
Accepté pour publication par *Chem. Res. Toxicol.* (2007)

Near-UV photolysis of 2-methyl-1,4-naphthoquinone -DNA duplexes:  
Characterization of reversible and stable interstrand cross-links between  
quinone and adenine moieties

Francois Bergeron<sup>1</sup>, Klaus Klarskov<sup>2</sup>, Darel J. Hunting<sup>1</sup>, and J. Richard Wagner<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Group in the Radiation Sciences and <sup>2</sup>Mass Spectrometry Laboratory, Department of  
Pharmacology, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de  
Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, J1H 4N5.

TOC





## Abstract

Near-UV photolysis of 2-methyl-1,4-naphthoquinone (MQ, menadione) tethered DNA induces initial charge transfer followed by either transport of the damage to G or formation of interstrand cross-links between MQ and DNA bases. In this work, the products responsible for interstrand cross-links have been characterized by mass spectrometry, NMR and comparison with model compounds. Three major products were formed in the photolysis of MQ-DNA duplexes. Two of the products (isomers) have a cross-link between C2 of a 2,3-saturated MQ moiety and N6 (or N1) of a dAdo moiety. These products readily convert back to MQ and dAdo upon heating in neutral solution, and thus, they lead to reversible cross-links in MQ-DNA duplexes. The third product has a cross-link between C3 of a 2,3-unsaturated MQ moiety and N6 (or N1) of an dAdo moiety. This product was stable in neutral solution. The formation of MQ to A cross-links in DNA may be explained by the coupling of MQ radicals that arise from protonation of MQ radical anions, together with adenine-N6-yl radicals that arise from deprotonation of A radical cations.

## Introduction

DNA interstrand cross-links are very toxic for cells because this damage is difficult to process by cellular DNA repair(1,2). For example, mitomycin C, psoralen, nitrogen mustard and cis-platin, are all well-known cross-linking agents used in chemotherapy. Endogenous agents, such as malondialdehyde, which are produced during lipid peroxidation, and normal metabolism, can also have deleterious effects due to their ability to cross-link to DNA(3). There is much effort to develop novel DNA cross-linking agents in order to explore the biological processing of damage by DNA repair and replication using well-characterized substrates(4) and to design novel agents that ultimately enhance the deleterious effects of cross-links in cancer cells(5,6). In addition, it may be possible to employ cross-linking agents to knock-out specific sequences from the genome or silence sequences from the pool of cellular mRNA(7).

The ability of photosensitizers and light to induce cross-links in DNA has been demonstrated using a variety of modified DNA constructs. Cross-links have been reported to occur between pyridinium ruthenium complexes and DNA bases(8,9), vinyl and adenine moieties(10), and benzophenone and thymine moieties(11). Recently, a novel cross-link involving attachment of the methyl group of T with either N6 or N1 of A on the opposite DNA strand was induced by either UV-photolysis or reduction of T bearing phenyl selenide in duplex DNA(12).

There have been several studies addressing the effects of 2-methyl-1,4-naphthoquinone (menadione; MQ) as a potential radiosensitizer of hypoxic tumors and as a synergistic agent in combination with various chemotherapeutic agents(13). The mechanism of toxicity for MQ is not entirely clear. On one hand, MQ promoted apoptosis

in cells via its redox cycling properties(14), whereas on the other hand, it inhibited apoptosis following near-UV photolysis(15). Three mechanisms of action have been proposed to account for the action of MQ in cell culture: 1) generation of reactive oxygen species by quinone redox cycling and type II photosensitization (16); 2) conjugation of MQ with the thiol groups of proteins, leading to depletion of glutathione and changes in intracellular  $[Ca^{2+}]$  (17,18); and 3) direct activation of transcription factors and other proteins by arylation with MQ(19). Nevertheless, the propensity of naphthoquinones to undergo alkylation reactions with DNA has opened the door to the discovery of efficient cross-linking agents.

Considerable advances in the development of DNA cross-linking agents have come from chemical tuning of quinone methides. The reactivity of quinone methides toward DNA is remarkable because cross-links can be initiated by either bioreductive agents or light. These compounds have provided promising results as bifunctional crosslinking DNA agents(20,21) . Initial studies of quinone methides investigated the formation of covalent links between 5-methyl-1,4-naphthoquinone and DNA(22). DNA strands of quinone containing duplexes were inseparable as a result of quinone alkylation of neighboring DNA bases(23). The proposed mechanism of damage involved facile formation of a quinone methide at C5 followed by efficient nucleophilic attack of exocyclic amino groups of DNA bases including those of C, G and A. Similarly, near-UV light and MQ have been shown to induce the alkylation or base to base cross-linking of DNA. For example, the photosensitization of dinucleotides containing A with MQ and near-UV light was shown to alkylate A with formyl and acetyl groups(24, 25). The photolysis of polyA and polyU in the presence of MQ led to an increase in Raleigh

scattering, indicating the formation of interstrand cross-links in single stranded polymers(26).

The study of charge transfer (CT) in DNA is largely based on model systems in which photosensitizers are covalently attached to oligonucleotides and initial base radical cations are injected into DNA by photolysis. In particular, anthraquinone has been extensively used as a photosensitizer to study charge transfer in DNA. Although there is a serious lack of information about the exact structure of damage, the main type of damage reported in the study of CT in DNA has been alkaline labile strand breaks at GG doublets and other sites of low oxidation potential(27-29). In an attempt to unravel the mechanism of CT in DNA, we built a model system in which MQ as a near-UV photosensitizer was covalently attached to duplex DNA(30). Early studies with MQ indicated that this molecule efficiently oxidizes nucleic acid components in solution(31-40). The mechanism of photosensitization involved initial CT from nucleobases to excited menadione, giving rise to the corresponding base radical cations and MQ radical anions. Similar to studies of MQ in solution, MQ attached to DNA appeared to induce damage at the four DNA bases. Although the formation of piperidine labile break at GG doublets was detected, the majority of damage estimated by base loss appeared to occur at A and T. Surprisingly, we also observed the formation of interstrand cross-links in the photolysis of MQ-DNA duplexes. In the present work, we report the characterization of three major photoproducts of MQ-DNA duplexes, which are responsible for the formation of interstrand cross-links.

**Experimental Section**

Nuclease P1, alkaline phosphatase and snake venom (SV) phosphodiesterase were provided by MP Biomedicals, Roche and USB, respectively. Oligonucleotides were synthesized by AlphaDNA (Montreal, Canada) and their mass verified by MALDI-TOF. MQ-modified oligonucleotides were synthesized and purified as previously described(30). Uni-link AminoModifier phosphoramidite was obtained from Clontech and incorporated into an internal position during oligonucleotide synthesis. Chemical reagents were purchased from Aldrich except 6-amino-2-hydroxymethylhexan-1-ol, which was acquired from Toronto Research Chemicals.

**Preparation of MQ-linker.** 2-Methyl-1,4-naphthoquino-6-carboxylic acid was synthesized as previously reported. Thirty mg (138  $\mu$ mol) was dissolved in 5.75 mL of anhydrous DMF. To this solution, benzotriazol-1-yloxy-tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (pyBOP, 79.5 mg, 0.152 mmol), diisopropylethylamine (DIEA, 26.5  $\mu$ L, 0.152 mmol) and 6-amino-2-hydroxymethylhexan-1-ol (22 mg, 0.152 mmol) were added and the mixture was stirred under an argon atmosphere and protected from light. After 20-30 min, the reaction was quenched by addition of 20 mL of 100 mM triethylammonium acetate (TEAA) pH 5.5, dried under reduced pressure and extracted with H<sub>2</sub>O (2 x 20mL) and EtOAc (20mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrated and purified by flash column chromatography (silica gel, starting with 100% CHCl<sub>3</sub> and increasing CH<sub>3</sub>OH percentage from 1 to 4). R<sub>f</sub> = 0.25 in 10% CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub>. Yield 24 mg (48%). <sup>1</sup>H-NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>).  $\delta$  1.05–1.30 (m, 13H, -CH<sub>2</sub> from linker), 1.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.95 (m, 2H, OH), 6.60 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 7.77 (d, 1H, H<sub>7</sub>), 7.84 (s, 1H, NH), 7.94 (d, 1H, H<sub>8</sub>), 8.07 (d, 1H, H<sub>5</sub>).

**Near-UV Photolysis.** The photolysis apparatus and procedures were similar to those reported previously with slight changes to accommodate the larger amounts of MQ-DNA duplexes. Three mg of duplex DNA were subjected to photolysis at 365 nm following conditions described previously(30). To shorten the photolysis time, the monochromator slits were opened to a maximum ( $365 \pm 5$  nm), and the solution was placed in a 4 mL quartz cuvette with a large enough surface for the light beam (8 mm). Solutions were bubbled for 20 min with O<sub>2</sub> prior to photolysis, or they were degassed with N<sub>2</sub> in a air-tight cuvette before and after the removal of aliquots. In order to produce a maximum of photoproducts, photolysis was stopped when the products reached a plateau as inferred by HPLC. The yield of cross-links was estimated to be 1% by UV absorption and comparison to non-modified digested nucleosides. The fluence impinging on the cuvette was  $1.26 \times 10^{-9}$  Einstein/min (+/-20%).

**Photolysis of MQ and dAdo as monomers.** The photolysis of a concentrated mixture of dAdo and MQ gave products **2c-4c**. dAdo (1g, 3.7 mmol) was dissolved in 50 mL of a 3:2 CH<sub>3</sub>CN /H<sub>2</sub>O mixture and MQ (650 mg, 3.8 mmol) was dissolved in 50 mL of 100% CH<sub>3</sub>CN. Two mL of each solution were poured in a 9 cm diameter glass petri dish and the mixture was allowed to dry for 10 minutes under a hood on a horizontal surface to ensure the formation of a homogeneous film. The dry deposit was illuminated for 30 min with a 250 W medium pressure Hg lamp at a distance of 15 cm. The photoproducts were recovered by washing the petri dish with 2 mL of a 20% water solution in CH<sub>3</sub>CN. These steps were repeated for the remaining solution of dAdo and MQ. The total product mixture was dried under vacuum and extracted first with H<sub>2</sub>O and hexane (100 mL). The insoluble material was eliminated by filtration and the aqueous phase was extracted again

with 2 x 100 mL EtOAc. This latter solution was dried under vacuum and the remaining material purified by HPLC. The preparation of products **2b-4b** followed a similar procedure as above. In the case of products containing MQ-linker, the yield was higher in CH<sub>3</sub>OH compared to a mixture of H<sub>2</sub>O and CH<sub>3</sub>CN. First, dAdo and MQ-linker (70 mM, 50  $\mu$ l each) were mixed with 650  $\mu$ l of CH<sub>3</sub>OH and the solution was poured on the surface of a 5 cm diameter glass petri dish. After 10 min of air drying at ambient temperature, the solution gave a transparent film of dAdo and MQ-linker. The petri dish was illuminated for 30 min at a distance of 15 cm. The products were collected in 750  $\mu$ l of CH<sub>3</sub>OH and purified by HPLC. The total yield of products was estimated at 3% relative to the starting material.

**Enzymatic hydrolysis of DNA to its components.** Oligonucleotides were digested to their component nucleosides by nuclease P1 and alkaline phosphatase. First, 5 $\mu$ l of nuclease P1 (1 unit/ $\mu$ l) was added per 100  $\mu$ l of DNA solution. Then, 5 units of alkaline phosphatase were added without buffer. The mixture was incubated at 37°C for 30 min after each enzyme addition. Products **2a**, **3a** and **4a** were further digested with snake venom phosphodiesterase at pH 7.0 and room temperature with 1 unit of enzyme per  $\mu$ g of substrate. The digestion was terminated after 20 min.

**HPLC analysis.** HPLC analysis was carried out using Alliance systems (Waters 2795 or 2690) connected to dual wavelength UV detectors (Waters 2487) and a Millenium workstation (Waters version 4). MQ-DNA duplexes of oligonucleotides (**Figure 1**) were prepared by dissolving of both strands (1500  $\mu$ g) in 6 mL of 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), heating the solution (25  $\mu$ M) for 5 min at 70°C in a water bath to allow for complete denaturation, and then slowly cooling the solution to room temperature over a

period of 90 min. The resulting duplexes were exposed to near-UV photolysis ( $365\text{ nm} \pm 5\text{ nm}$ ) in batches of 1.5 mL, and aliquots of 4  $\mu\text{L}$  were removed during photolysis at 0, 60, 120 and 240 min. Each aliquot was analyzed by HPLC to monitor the formation of DNA cross-links. The analysis of oligonucleotides was carried out on a reversed phase column (3 $\mu$  ODS-AQ 150 x 6 mm; YMC) using a gradient starting at 92% solvent A1 and 8% solvent B for 5 min and going to 82% solvent A1 and 18% solvent B in the next 25 min (0.5 % / min; method I). Solvent A1 was composed of 25 mM triethylammonium acetate (TEAA; pH 7.0) containing 2.5% acetonitrile. Solvent B was composed of 95%  $\text{CH}_3\text{CN}$  and 5%  $\text{H}_2\text{O}$ . The flow rate was 1 mL /min and the column was maintained at a temperature of 60°C. Alternative conditions were used for the analysis of small DNA components obtained by enzymatic digestion of MQ-DNA duplexes. In this case, the mixture of DNA components was separated on a reversed phase column (5 $\mu$  ODS-A 250 x 6 mm; YMC) with a gradient starting at 95% solvent A2 and 5% solvent B for 10 min and going to 63.5% solvent A2 and 36.5% solvent B in the next 65 min (0.57 % / min), where solvent A2 was composed of 25 mM triethylammonium acetate (TEAA; pH 5.5) containing 2.5%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (method II). The flow rate was 1 ml/min and the column was maintained at a temperature of 30°C. Oligonucleotides and nucleosides were detected at both 260 and 340 nm. The separation of products resulting from the photolysis of MQ-linker and dAdo was achieved with the same column as in method II using a gradient starting at 100% solvent A2 and going to 65% solvent A2 and 35% solvent B in 30 min (1.17 % / min) followed by an additional 10 min with 35% solvent A2 (method III). Similarly, the separation of photoproducts from MQ and dAdo was carried out using the same conditions except that the gradient increased from 0% to 40% solvent A2 (1.33% /



min, method IV). The large-scale purification of MQ and dAdo photoproducts was carried out on a 5 $\mu$  ODS-AQ 250 x 10 mm YMC column under isocratic conditions with 19 % CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O at a flow of 3 mL/min. These conditions also permitted the separation of **2c** and **3c**.

**Mass spectrometry analysis.** ESI-MS/MS was carried out using a Q-tof-2 instrument and MALDI-TOF on a ToF Spec 2E instrument both from Micromass. For ESI-MS/MS analysis, samples were dissolved in either 50 % CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O or 50 % acetonitrile/D<sub>2</sub>O solutions containing 1 mM NaCl. Continuous injection was done with an automated syringe at a flow of 0.6  $\mu$ L/min and 2.3 kV electrospray voltage. The cone voltage was set to 45 V and the instrument was calibrated by infusing a standard NaI solution (0.2 mg/ml) in 50% aqueous isopropanol.

**<sup>1</sup>H-NMR analysis.** <sup>1</sup>H-NMR measurements were performed using Bruker 300 MHz and Varian 600 MHz spectrometers. <sup>1</sup>H-NMR analysis of **2b** and **3b** obtained from DNA was carried out with 10-20  $\mu$ g of pure material. Because this quantity was about 100 times lower to that required for routine analysis, the acquisition time of samples was extended to 10-15 h. Under these conditions, and at a reduced temperature of 10°C, there was considerable (<20%) decomposition of **2b** and **3b** to the corresponding non-modified compounds (dAdo and MQ-linker). In <sup>1</sup>H-NMR analysis, the region of the spectra between 0 and 5.5 ppm was ignored because of the presence of low-level contaminants in the sample. MQ-linker-pA (**1**) was digested to MQ-linker by snake venom phosphodiesterase because it was not stable in dilute solution during the long acquisition time required for analysis. The analysis of trace compounds obtained from the photolysis and digestion of DNA was performed in D<sub>2</sub>O. In contrast, the analysis of compounds

obtained from the photolysis of monomers was carried out in acetone because they were more non-polar and did not dissolve in D<sub>2</sub>O at higher concentration. We prepared 1 mg quantities of model compounds for comparison NMR analysis.

## Results

Interstrand cross-links were efficiently produced by UV photolysis of MQ-DNA duplexes containing MQ when it was tethered to a central position on one strand and opposite to A on the complementary strand (ODN 1/2; see **Figure 1**). The formation of interstrand cross-links was demonstrated by PAGE analysis, which showed the appearance of ODN bands that migrated slower than the parent strands under denaturing conditions (**Figure 2**). The formation of cross-links was also observed by HPLC analysis, which showed an additional ODN peak that eluted between the complementary and MQ-containing strands (data not shown). To determine the structure of interstrand cross-links, irradiated MQ-DNA duplexes were digested to their component nucleosides by P1 nuclease and alkaline phosphatase. In addition to the four non-modified nucleosides, we observed the presence of several new peaks in the chromatogram of irradiated samples that eluted later than single nucleosides on reversed phase HPLC (**Figure 3**). The peak at ~48 min was observed in non-irradiated samples and it decreased as a function of time of photolysis. On the basis of MS analysis (**Figure S1**), this peak corresponds to non-modified MQ-linker attached to non-modified A (MQ-linker-pA; **1**; see structure in **Figure 4**). Although this compound decomposed during NMR analysis, the presence of the MQ-linker moiety was confirmed after removal of dAdo by an alternative enzyme, snake venom (SV) phosphodiesterase (**Figure S2**). In addition, it should be noted that **1** was detected by digestion with P1 nuclease of ODN 1-5T but not ODN 1-3T (see **Figure 1**), indicating that compound **1** retains A on the 3'-side of the MQ moiety. These findings indicate that P1 nuclease does not cleave the phosphodiester bond on the 3'-side of MQ-

linker, which is consistent with the sequence specificity of P1 nuclease toward base modifications(41, 42).

Three major peaks eluted slightly before MQ-linker-pA (**1**) on reversed phase HPLC in the analysis of irradiated MQ-DNA duplexes (**2a-4a**, **Figure 3**). These peaks increased at the expense of **1** as a function of photolysis time (**Figure S3**). The photolysis of single stranded ODN **1** did not produce **2a-4a** although **1** decreased and gave rise to other peaks in the chromatogram. The yield of products **2a-4a** by HPLC analysis was approximately 60% compared to the yield of cross-links by PAGE analysis suggesting that products **2a-4a** represent about half of total cross-links. The consumption of **1** was slightly less in deoxygenated (N<sub>2</sub>-bubbled) compared to oxygenated (O<sub>2</sub>-bubbled) solutions. Relative to the loss of **1**, the rate of formation of **2a-3a** was equal in both deoxygenated and oxygenated solution, whereas the rate of formation of **4a** decreased in deoxygenated solution (**Figure S3**). Additional experiments were carried out to determine whether the photolysis of MQ-DNA duplexes produced MQ hydroquinone. For these experiments, we prepared MQ hydroquinone independently by treatment of MQ-DNA duplexes with either sodium hydrosulfite or cytochrome C reductase/NADH (**Figures 3d and 3e**; MQ hydroquinone corresponds to the peak at ~34 min). The reduction of purified **1** gave the same peak observed in reduced and digested MQ-DNA duplexes. From comparison of the chromatograms, it is clear that MQ hydroquinone was not produced in the photolysis of MQ-DNA duplexes. Moreover, there was no evidence for the formation of cross-links by either HPLC or PAGE analyses. Thus, the chemical reduction of MQ-DNA duplexes does not produce interstrand cross-links under our conditions.

An interesting feature of products **2a** and **3a** was their ability to convert to non-modified **1** and 5'-AT-3' upon heating in either neutral or alkaline (1M piperidine) solution (**Figure 5**). The conversion of purified **2a** and **3a** was comparable to the conversion of interstrand cross-links to parent strands in MQ-DNA duplexes ( $\tau = 60$  min at 37 °C). In contrast to products **2a** and **3a**, product **4a** was resistant to heat under neutral and alkali conditions. The facile reversibility of cross-links is consistent with detachment of the cross-link from C2 by a concerted reaction which requires the presence of a proton at either C3 or C4-OH of the MQ moiety (**Scheme 1**).

Additional information about the structure of interstrand cross-links was gained by treatment of the products with snake venom (SV) phosphodiesterase. This enzyme has a different substrate specificity compared to P1 nuclease and it is known to hydrolyze the phosphodiester bond next to certain base modifications(43). Thereby, treatment of purified **2a** and **3a** with SV phosphodiesterase followed by alkaline phosphatase gave an equal amount of dAdo and dThd together with smaller fragments, **2b** and **3b**, respectively (**Figure 5c**). Similar to **2a** and **3a**, heat-treatment of **2b** and **3b** induced their conversion to a mixture of MQ-linker and dAdo (**Figure 5d**). The above results indicate that the products from P1 nuclease digestion (**2a-4a**; the **a** series of derivatives) are tetramer compounds composed of 5'-AT-3' of one strand covalently attached to MQ-linker and A of the opposite strand, whereas the products from SV phosphodiesterase digestion (**2b-4b**, the **b** series of derivatives) comprise the basic cross-link unit of MQ attached to dAdo.

The position of cross-links in MQ-DNA duplexes was determined by changing the nucleotide sequence next to the MQ moiety. First, we examined changes in the

sequence of the complementary strand (**ODN 2**, **2-5U**, **2-3U**, **Figure 1**). As shown in **Figure 6a**, the HPLC profile was nearly the same in sequences containing 5'-TAT-3' (**ODN 2**) and 5'-UAT-3' (**ODN 2-5U**). In contrast, the products corresponding to the tetramers (**2a-4a**) was shifted in sequences containing 5'-TAU-3' (**ODN 2-3U**). The new products (analogous to **2a-4a**) contained U because they released dUrd upon further digestion with SV phosphodiesterase and each products (analogous to **2a** and **3a**) converted to MQ-A and 5'-AU-3' upon heating as inferred by HPLC analysis with standard compounds (results not shown). Thus, non-modified T in tetramers (**2a-4a**) comes from T on the 3' side of A of the complementary strand. Next, we examined changes in the sequence of the MQ-conjugated strand MQ (**ODN 1-5T**, **ODN 1-3T**, **Figure 1**). These studies revealed that tetramers (**2a-4a**) arise from sequences with 5'-T-MQ-A-3' but not with 5'-A-MQ-T-3' (**Figure 6d** and **6e**). The latter sequence generated similar products except that they contained T instead of A on the 3' side of MQ as inferred by HPLC analysis of heat-treated or SV phosphodiesterase digested samples. Thus, non-modified A in tetramers (**2a-4a**) comes from A on the 5' side of MQ. In summary, tetramers (**2a-4a**) have a cross-link between the A moiety of 5'-AT-3' and the MQ moiety of 5'-MQ-A-3' from opposite strands in MQ-DNA duplexes.

### Structural analysis of cross-links in MQ-DNA duplexes

Products **2** and **3** for each series of derivatives (**a** to **c** series) are likely isomers in view of the fact that they have nearly identical chromatography properties, UV absorption (260 nm / 340 nm = 38) and MS features (**Table 1**, **Figure 7**). Here we focus our attention the analysis of **2b** and **3b**. The mass of both **2b** and **3b** ( $m/z$  619,  $M+Na^+$ ) contained the mass of dAdo ( $m/z$  251) plus the mass of MQ-linker ( $m/z$  345). Thus, the structure of **2b** and

**3b** includes two additional hydrogen atoms to account for the removal of two hydrogen atoms in the formation of a covalent bond between MQ and dAdo. This suggests that the C2-C3 double bond of the MQ moiety has been reduced during the addition of dAdo. It should be noted that reduction of the C2-C3 double bond of MQ gives a semi-hydroquinone structure by virtue of its ability to undergo keto-enol tautomerism (**Scheme 2**). Upon fragmentation in the mass spectrometer, both **2b** and **3b** gave two daughter peaks at  $m/z$  274 (dAdo+Na<sup>+</sup>) and at  $m/z$  368 (MQ-linker+Na<sup>+</sup>). This reaction was analogous to the cleavage of **2b** and **3b** into non-modified MQ-linker and dAdo in solution. Lastly, the relatively low absorption of **2b** and **3b** at 340 nm (260 nm / 340 nm = 38) compared to **1** (260 nm / 340 nm = 11) (**Table 1**) also points to saturation of the C2-C3 double bond of MQ and conversion to a semi-hydroquinone. Additional information was obtained by MS analysis of deuterated compounds. For these analyses, **2b** and **3b** were dried and equilibrated in D<sub>2</sub>O for at least 12 h at 4°C prior to MS analysis in D<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN. The results show these molecules accommodate eight exchangeable protons ( $m/z$  627 –  $m/z$  619; **Figure 7**) including five exchangeable protons on the MQ-linker protons and three exchangeable protons on dAdo (see structure in **Figure 4**). From these results, we conclude that dAdo is attached to MQ via a position of dAdo that carries an exchangeable proton, i.e., either N6 or N1. Interestingly, when the ion at  $m/z$  627 was selectively fragmented in the mass spectrometer, it gave two fragments with masses of  $m/z$  372 and  $m/z$  278, which corresponded to the incorporation of four deuteriums each on MQ-linker and on dAdo, respectively. Thus, the dAdo moiety gained one deuterium (3 to 4) while the MQ moiety lost one deuterium (5 to 4) indicating that an exchangeable proton was transferred from the MQ moiety to the dAdo moiety during fragmentation in

the spectrometer. This is consistent with the proposed mechanism of reversion involving a concerted reaction in which cleavage of the cross-link to initial compounds is integrated with conversion of the semi-hydroquinone to renewal of the quinone (**Scheme 1**).

The structure of **2b** and **3b** was further examined by  $^1\text{H}$ -NMR. These analyses were carried out with small amounts of compound (5-10  $\mu\text{g}$ ) obtained from irradiated MQ-DNA duplexes, and thus, the analysis was limited to the region between 5-8 ppm. The spectra were interpreted by direct comparison of freshly purified sample with heat-treated samples in which the cross-link was converted to individual dAdo and MQ-linker components. The analysis of purified MQ-linker and dAdo was also carried out under the same conditions (**Figure S2; S4**). The spectrum of **2b** was not substantially different than that of heat-treated **2b**, indicating that the majority of **2b** split into its components before or during NMR analysis (**Figure S5**). In contrast, the spectrum of **3b** differed markedly from that of heat-treated sample, giving us the opportunity to obtain information about the structure of this isomer (**Figure 8**). The majority of peaks in the spectrum of **3b** were assigned on the basis of their similarities with the spectra of heat-treated sample together with that of purified MQ-linker and dAdo. The results are summarized in **Table 2**. These analyses show two striking differences in the spectrum of **3b** compared to the spectra of monomeric compounds. First, the peak at 6.60 ppm in the spectrum of **3b** was minor (10%) in both fresh and heat-treated samples. In contrast, this peak was present in the spectra of MQ-linker-pA (**1**) corresponding to C3-H of an intact MQ moiety. The inability to regenerate the C3-H peak of MQ-linker after heating the sample indicates that C3-H of **3b** was an exchangeable proton. Thus, the structure of **3b** must have a 2,3-saturated quinone or semi-hydroquinone structure which permits exchange via keto-enol



tautomerism (**Scheme 2**). The presence of a small signal for MQ-linker with C3-H in the spectrum (10%) can be explained by partial reversal of **3b** to MQ-linker and dAdo during its purification in H<sub>2</sub>O. The second difference in the spectra of **3b** and standard compounds was the absence of a peak at 7.94 ppm together with the presence of a new peak at 7.72 ppm (**Figure 8**). The peak at 7.94 ppm likely corresponds to C5-H of MQ-linker in heat-treated and purified samples. Thus, C5-H of **3b** undergoes a downfield shift from 7.72 to 7.93 ppm (0.2 ppm) when the cross-link between dAdo and the MQ moiety is broken. This shift may be explained by different shielding effects for the OH group of a semi-hydroquinone as in **3b** compared to the carbonyl group of a quinone structure as in MQ-linker. In simulated spectra, the estimated chemical shift of C5-H proton for **3b** in the proposed semi-hydroquinone form was 8.07 ppm, whereas that for either **3b** in the quinone form (8.66 ppm) or MQ-linker (8.69 ppm) was much higher. These analyses suggest that **3b** exists predominantly in the semi-hydroquinone rather than the quinone form. Although partial NMR analysis of **3b** from MQ-DNA duplexes supports the proposed structure, it was necessary to study model compounds (addressed later) to determine the exact site of attachment of dAdo to MQ (either C2 or C3).

#### **Characterization of products 4b from MQ-DNA duplexes**

The analysis of **4b** revealed a number of interesting differences in the structure of this cross-link compared to that of **2b** and **3b**. First, **4b** was stable at ambient temperature and neutral pH and there was no evidence of reversal to initial components or decomposition into other products under these conditions. Secondly, the absorption of **4b** at 340 nm was much greater than that of **2b** or **3b** (**Table 1**). In fact, the ratio of absorption of **3b** ( $260/340 = 10$ ) was comparable to the ratio of absorption of MQ-linker-

pA (1). Thus, the MQ moiety remains intact in this cross-link. Thirdly, the molecular ion of **4b** ( $m/z$  617,  $M+Na^+$ ) corresponds to the molecular weight of dAdo ( $m/z$  251) plus MQ-linker ( $m/z$  345) minus two hydrogen atoms (**Figure S6**). The loss of 2 hydrogen atoms indicates that the MQ moiety has an intact 2,3-double bond. The mass of **4b** increased from  $m/z$  617 in  $H_2O$  to  $m/z$  623 in  $D_2O$ , indicating the presence of 6 exchangeable protons (**Figure S6**). Thus, MQ-linker is connected to dAdo via an atom with an exchangeable proton (i.e., N6-H or N1-H of dAdo). The cross-link was robust even at high collision energy. The only daughter peak in the fragmentation spectrum was observed at  $m/z$  505 ( $M+Na^+$  minus 2-deoxyribose) (**Figure S6**). The structure of **4b** was examined in greater detail by NMR analysis (**Figure S7**). The peaks in the range of 6-8 ppm for **4b** were assigned on the basis of comparison with the spectra of dAdo and MQ-linker. In fact, the spectrum of **4b** was nearly identical to the sum of spectra for dAdo and MQ-linker except that the peak for C3-H of the MQ moiety was absent and the peak for C2-H of the dAdo moiety was shifted downfield by 0.1 ppm. The lack of any change in the chemical shift of C5-H indicates that, in agreement with its absorption and MS properties, the MQ moiety remains intact. In summary, the analysis of **4b** are consistent with a structure in which dAdo is attached to C3 of an intact MQ moiety with an unsaturated 2,3-double bond.

### Preparation of cross-links by photolysis of dAdo and MQ

The photolysis of MQ-linker and dAdo in solution led to rapid degradation of MQ without any apparent formation of photoadducts. In contrast, photolysis in the dry state generated several products including three major products with a polarity between MQ-

linker and dAdo on reversed phase HPLC. These products were the same as those obtained by the photolysis and digestion of MQ-DNA duplexes (**2b-4b**). They displayed the same retention time and UV absorption ratio at 260 and 340 nm on HPLC (**Figure S8**). In addition, two products (**2b** and **3b**) converted to MQ-linker and dAdo upon heating, whereas the third product (**4b**) remained stable under these conditions. Lastly, the products obtained by the photolysis of monomers displayed identical MS features as those obtained from irradiated MQ-DNA duplexes. Thus, the photolysis of MQ-linker and dAdo monomers in the dry state generated the same adducts as the photolysis of MQ-DNA duplexes. To prepare model compounds for NMR studies, we carried out the same reaction with commercially available MQ instead of MQ-linker. Similar to the photolysis of MQ-linker and dAdo, the photolysis of MQ and dAdo gave three major products that eluted between MQ and dAdo on reversed phase HPLC. The structure of these photoproducts (referred to as the **c** series of derivative; **2c-4c**) was analogous to those generated by the photolysis of MQ-linker and dAdo as inferred by the UV absorption ratio at 260 and 340 nm, the ability to convert back to MQ and dAdo upon heating (**1c** and **2c**), together with MS and NMR analyses (**Table 1**, **Figure S9-S12**).

The structural features of MQ-dAdo adducts obtained from monomers (**2c** and **3c**) were very similar to those obtained from MQ-DNA duplexes (**2b** and **3b**). The parent peaks of both **2c** and **3c** were observed at  $m/z$  424 ( $M+H^+$ ) and  $m/z$  446 ( $M+Na^+$ ) corresponding to the mass of MQ and dAdo (**Figure S9**). Thus, MQ-dAdo adducts (**2c** and **3c**) must have two additional hydrogen atoms to account for the loss of two hydrogen atoms in the formation of covalent bond between dAdo and MQ. Fragmentation of the molecular ions ( $m/z$  446) showed the loss of 2-deoxyribose ( $m/z$  330), the loss of MQ

( $m/z$  274), the loss of dAdo ( $m/z$  195) as well as the loss of 2-deoxyribose and MQ ( $m/z$  158). These features were nearly identical to those of **b** series of derivatives (**2b** and **2b**). The molecular ion of **2c** and **3c** increased by three mass units ( $m/z$  446 to 449) upon equilibration in D<sub>2</sub>O, indicating the presence of three exchangeable protons. The fragmentation spectrum of  $m/z$  449 showed that the entirety of exchangeable protons was located on dAdo with two protons on the 2-deoxyribose moiety and one on the base moiety (**Figure S9**). The final result is the same as that obtained in the analysis of **2b** and **3b** that is the base moiety has one less exchangeable proton than it should and thus dAdo is covalently attached to MQ via a site with an exchangeable proton (N6 or N1). These results were surprising however because no exchangeable protons were observed on the MQ moiety of **2c** and **3c** whereas two exchangeable protons were observed on the C6-substituted MQ moiety of **2b** and **3b**. This indicates that proton exchange with D<sub>2</sub>O is largely suppressed for the **c** series of derivatives compared to the **b** series of derivatives (**Scheme 2**). It was not possible to study this reaction at higher temperatures (>37°C) or in basic solution (>pH 7) because MQ-dAdo adducts readily undergo reversal to monomers under these conditions.

The NMR spectra of **2c** and **3c** were nearly identical. The majority of peaks in the spectra may be attributed by comparison with dAdo, MQ and the corresponding hydroquinone of MQ obtained by bisulfite reduction (**Figure S10**). Three peaks in the spectra of **2c** and **3c** disappeared upon addition of D<sub>2</sub>O. The exchangeable protons included C3'-OH (5.03 ppm, 1H, m) and C5'-OH (4.41 ppm, 1H, m) of the 2-deoxyribose moiety together with N6-H or N1-H of dAdo (7.12 ppm, 1H, s). There was no evidence for the exchange of other protons in agreement with MS analysis in D<sub>2</sub>O.

The spectra of the MQ and dAdo adducts (**2c** and **3c**) displayed two striking differences with respect to the spectra of monomeric compounds. First, there was no signal for C3-H of the MQ moiety in the spectra of **2c** and **3c**. This proton gave a signal at 6.60 ppm for MQ while it was at 6.3 ppm for the corresponding hydroquinone. The absence of this proton in the spectra of **2c** and **3c** was also observed in the analysis of the **b** series of derivatives. Again, this result points to saturation of the 2,3-double bond of MQ. Secondly, and most importantly, the spectra of **2c** and **3c** displayed two new signals with chemical shifts in the region of methylene protons (4.06 and 2.96 ppm). Furthermore, these protons displayed very strong coupling ( $J=15.6$  Hz) and gave rise to a strong cross-peak in COSY analysis, indicating that they are geminal protons. The only position to accommodate these protons in the molecule is C3 of the MQ moiety, and thus, the dAdo moiety must be attached to C2 of the MQ moiety. The structure of **2c** and **3c** is analogous to the products obtained by photoacylation of butyraldehyde and MQ (**44**). Similarly, the authors reported the formation of a product with two well separated doublets with a strong H-H coupling constant. An analogous compound was also reported as a side-product in the synthesis of vitamin K derivatives but no details about the NMR analysis were given. The chirality of the carbon at C2 of the MQ moiety explains the existence of two isomers in the photolysis mixture. Thus, the analysis of model compounds supports the proposed structure of MQ-dAdo adducts in which MQ is attached to dAdo via the C2 position of a 2,3-saturated MQ moiety and the N6 or N1 position of dAdo.

The third MQ-dAdo adduct (**4c**) gave essentially the same results by MS analysis as the analogous adduct obtained from MQ-DNA duplexes (**4b**). The mass of **4c** ( $m/z$  444,  $M+Na^+$ , **Figure S11**) corresponded to the mass of dAdo plus the mass of MQ minus

two hydrogen atoms. Subsequent fragmentation of the parent ion ( $m/z$  444) gave a single ion ( $m/z$  328) corresponding to the loss of 2-deoxyribose ( $m/z$  116). Thus, **4c** was very resistant to fragmentation to MQ and dAdo components in the spectrometer similar to the other derivatives (**4a** and **4b**). Subsequent analysis of **4c** in D<sub>2</sub>O revealed the presence of three exchangeable protons ( $m/z$  = 447) with two protons on the 2-deoxyribose moiety and one proton on the remaining fragment. Again these results indicate that dAdo is attached to MQ via a site with an exchangeable proton (N6 or N1 of dAdo). The site of attachment of the MQ moiety was further investigated by NMR. The spectrum of **4c** was very similar to the combined spectra of MQ and dAdo (**Figure S12**) except for the absence of a proton at C3 of MQ as well as a proton at N6 (or N1) of dAdo. Lastly, the number and location of exchangeable protons observed by NMR agreed well with the results obtained from MS analysis. The above results support the proposed structure of **4c** with a covalent bond between C3 of MQ and N6 (or N1) of dAdo moieties.

## Discussion

2-methyl-1,4-naphthoquinone (menadione; MQ) is one of the most efficient near-UV photosensitizer of DNA components. The initial step of oxidation involves charge transfer from DNA bases to triplet excited MQ resulting in the formation of base radical cations and MQ radical anions. This was supported by flash photolysis of MQ and nucleoside mixtures showing the matching decay of triplet MQ and growth of MQ radical anions together with the appearance of DNA base radical cations(45). Additional studies of transients by ESR also supported the formation of MQ radical anions and base radical cations(34). The mechanism of MQ-photosensitized oxidation has been studied in detail by product analysis and isotopic labeling using dThd and dCyd as substrates(40). The analysis of intermediate hydroperoxides clearly indicates that dThd radical cations are involved in the mechanism of decomposition because the addition of H<sub>2</sub>O takes place at C6 (the cation center) and the incorporation of O<sub>2</sub> at C5 (the radical center) (38). The study of MQ-photosensitized oxidation has been extended to complex DNA components. The photochemical reaction of MQ with nucleotides, dinucleotides and DNA led to the decomposition of these substrates with the formation of various base modifications(46-48). In the case of MQ photosensitized oxidation of dCpdC, new products were identified in which the C moieties were attached via a covalent bond between N3 and C6 positions. The ability of MQ to photosensitize DNA components was also examined using polyA as a substrate. These studies indicated that the reaction of excited MQ with polyA led to the formation of MQ radical anions(26). Again, this suggests that the initial step of photosensitization is charge transfer and that A radical cations are formed in the process. Interestingly, the authors reported the formation of cross-links within polyA. Therefore,

the latter studies with more complex DNA substrates support initial studies with monomers that indicate that the predominate type of photochemistry of MQ with nucleic acids is charge transfer leading to MQ radical anions and base radical cations. Recently, we demonstrated the ability of MQ to induce DNA damage in synthetic MQ-DNA duplexes in which MQ was covalently bound to a central position (30). In particular, this damage included piperidine labile breaks at distal GG doublets, with greater damage on the 5'-side of the doublet, indicating initial charge transfer from MQ to DNA bases in MQ-DNA duplexes and subsequent migration and chemical reaction of the charge at GG doublets. This is similar to the photolysis of anthraquinone-DNA duplexes, which has been studied extensively as a model of charge transfer in DNA. In addition, we observed the formation of frank and piperidine labile breaks on the complementary strand opposite to MQ, the decomposition of all four DNA bases ( $A > T > G > C$ ), and the formation of interstrand cross-links. Because the main reaction mode of excited MQ with DNA components is charge transfer, we propose that this is also the first step in the formation of other types of damage in DNA induced by MQ photolysis including interstrand cross-links (**Scheme 3**).

MQ radical anions may undergo protonation while A radical cations undergo deprotonation to the corresponding neutral radicals. In the case of MQ radical anions, the  $pK_a$  for the radical pair  $MQH\cdot / MQ^{\cdot-}$  is only 4.8, and thus, protonation of MQ radical anions may be slow but favored under neutral conditions(49). On the other hand, A radical cations are very acidic with a  $pK_a$  equal or inferior to 1, and thus, they will rapidly deprotonate under these conditions(50). In addition to proton equilibrium with the solvent, the radical ion pair may undergo direct proton exchange in hydrophobic



environments such as duplex DNA. Indeed, Basu and co-workers reported a major contribution of neutral MQ radicals in the transient spectra of MQ and dAdo in SDS-induced micelles but not in homogeneous acetonitrile solution(51). Although they attributed the neutral MQ radicals to H-atom abstraction, an alternative explanation is that charge transfer initially takes place followed by rapid proton exchange between ion pairs. Both duplex DNA and charged micelles may facilitate proton exchange reaction because they create a locally high concentration of reactants in a relatively hydrophobic environment. This underlines the necessity to use nearly dry conditions to generate adducts by an intermolecular reaction between MQ and dAdo. Furthermore, MQ may undergo  $\pi$ -stacking with nucleobases in duplex DNA (especially with dAdo in our sequences), which would increase the probability of reaction and limit the reaction with other molecules in the system such as that with O<sub>2</sub>.

The formation of two products in which A is attached to either C2 or C3 of MQ (2-4) can be explained by the existence of two radical precursors: one in which the radical center is at C2 of MQ and the other in which the radical center is at C3 of MQ. The condensation of C2 centered radicals of MQ with adenin-N6-yl radicals directly leads to the structure of 2 and 3 without further transformation. On the other hand, the condensation of C3 centered radicals with adenin-N6-yl radicals affords an unstable adduct that subsequently undergoes auto-oxidation to the fully oxidized quinone. Interestingly, products 2 and 3 were resistant to electrochemical oxido-reduction. The inability to oxidize or reduce these compounds indicates that substitution at C2 of MQ disrupts the quinone structure and blocks keto-enol tautomerism of the vicinal carbonyl group. The fact that this structure blocks subsequent reformation of the quinone ring

allows these compounds to undergo reversal back to MQ and A (**Scheme 1**). On the other hand, substitution at C3 of MQ gives an intermediate hydroquinone, which undergoes auto-oxidation to give product **4** with an intact quinone ring. Alternatively, the intermediate hydroquinone may give the reverse reaction to MQ and A by the same transformation as products **2** and **3** (**Scheme 1**).

The structure of products **2-4** is analogous to that of products arising from the photoacylation of MQ as well as from the non-photolytic alkylation of MQ under certain conditions. The photoacylation of MQ with various aliphatic aldehydes was recently reported to generate addition products at both C2 and C3 of MQ(44). The formation of these products is similar to that of A-MQ cross-links in that the condensation of radicals occurred at both C2 and C3 of MQ. In this case, the ratio of addition at C3 was generally more efficient depending on the nature of the substituent at C2 of the 1,4-naphthoquinone. An attempt to generate adducts of MQ and A following a similar procedure used for the photoacylation of aldehydes was unsuccessful in our hands. Likewise, the structure of **2-4** is analogous to that of products arising from non-photolytic alkylation of MQ as reported in the synthesis of vitamin K derivatives(52). The corresponding products with substitution at either C2 or C3 of MQ were generated at low yields by the nucleophilic attack of phytyltrimethyltin. Additionally, it is worth noting that photoacylation and non-photolytic alkylation of MQ produced C2 adducts in which the quinone moiety was blocked in a semi-hydroquinone structure, together with C3 adducts in which the reduced hydroquinone was first formed followed by oxidation to the more stable quinone structure. These features are very similar to those of products **2-4**

except that the bond linking MQ to A is an amino group which is susceptible to cleavage and reversal to starting compounds.

Attachment of MQ to A may occur at either N6 or N1 of A. Indeed, it is very difficult to distinguish between these structures on the basis of conventional NMR analysis that is without isotope  $^{15}\text{N}$  labeling(53). To complicate matters, the two structures can interconvert via Dimroth rearrangement involving the transfer of substituents from N1 to N6. For example, the adducts of styrene epoxide and dAdo result from the initial attack of the imine at N1 of dAdo, followed by Dimroth rearrangement leading to adducts between styrene and N6 of dAdo. In the case of cross-links between MQ and A, we assume that MQ is attached to A via the N6 position of A because 1) the radical at N6 is more stable than that at N1 and deprotonation is most likely to occur at N6 (54); and 2) Dimroth rearrangement leads to the formation of N6 alkylated products as the final product even if the precursor of these products was a radical at N1(12, 53).

An alternative mechanism for the formation of cross-links involves the addition of adenin-N6-yl radicals to non-modified MQ. In this case, MQ radical anions must react with  $\text{O}_2$  in order to regenerate MQ prior to the attack of adenin-N6-yl radicals. Comparison of experiments conducted with and without  $\text{O}_2$  (**Figure S3**), however, indicate that  $\text{O}_2$  does not play a pivotal role in the formation of **2** and **3**. For this reason, it is more likely that products **2** and **3** are formed exclusively by the condensation of radicals, a reaction that does not require  $\text{O}_2$ . On the other hand, the formation of product **4** may involve the alternative mechanism to some extent because its yield was slightly higher in the presence than in the absence of  $\text{O}_2$ . The effect of  $\text{O}_2$  though is complicated by the fact that  $\text{O}_2$  and other oxidants, such as  $\text{O}_2$  radical anions and  $\text{H}_2\text{O}_2$ , may enhance

the auto-oxidation of hydroquinone intermediates to product 4. Thus, the lower yield of product 4 in the absence of O<sub>2</sub> may also be explained by a decrease in the rate of auto-oxidation accompanied with an increase in the reversal of products to MQ and A from the hydroquinone intermediate (**Scheme 1**). Finally, quinones are known to induce DNA alkylation by another pathway involving the initial formation of quinone epoxides. For example, the photolysis of MQ has been reported to generate epoxides of MQ. However, we can rule out this reaction in the case of MQ-DNA duplexes because the formation of epoxides is absolutely dependent on O<sub>2</sub> whereas products 2-4 are efficiently formed in both O<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>-saturated conditions (55).

Naphthoquinone methides are an important class of DNA cross-linking agents as described by Sartorelli co-workers and Rokita and co-workers(22,56). These intermediates can be generated by incubation with reductive agents or by near-UV photolysis of naphthoquinone and benzoquinone derivatives. The formation of cross-links by quinone methides involves nucleophilic attack of the methide moiety by exocyclic amino groups of cytosine and guanine with an optimal distance of 5 and 3 bases, respectively, from the quinone moiety on the complementary strand in duplex DNA. The resulting cross-links consist of a DNA base connected to the methyl substituent of an intact quinone moiety. Of naphthoquinone derivatives, the photolysis of 5-methyl-1,4-naphthoquinone gave the highest yield of methide induced cross-links with DNA. In comparison, MQ was a very poor inducer of this damage(23). In any case, the quinone methide pathway can be ruled out in our experiments because chemical reduction using the same reductants that produce quinone methides and cross-links in other model systems did not produce cross-links in MQ-DNA duplexes. Furthermore, the structure of

products 2-4 in MQ-DNA duplexes is not consistent with the expected structure of cross-links resulting from quinone methides (i.e., the exocyclic amino group of A is not attached to the methyl group of MQ). The inability to induce cross-links in MQ-DNA duplexes via methides may be related to the poor yield of methides from the photolysis of MQ or to the structure of these duplexes. In MQ-DNA duplexes, MQ was attached to DNA by means of a spacer to the benzylic ring of naphthoquinone. In contrast, the MQ moiety in constructs by Rokita and co-workers was linked via a thioether spacer directly on the quinone moiety. The presence of a substituent at C3 of MQ may have limited its reactivity toward the formation of cross-links by charge transfer and radical condensation. Interestingly, Yamada and co-workers used a similar oligonucleotide construct in which DNA was attached to MQ via a spacer at C3 to investigate charge transfer in DNA(57). In this work, the authors reported charge transfer at a distance leading to cleavage at 5-methylcytosine in the oligonucleotide, but they did not report the formation of cross-links. In both model systems (i.e., those of Rokita and Yamada), the availability of A for cross-link formation was not likely a limiting factor because this residue was in close vicinity to the MQ moiety. However, we cannot exclude the possibility that substitution at C3 affected the ability of MQ to undergo charge transfer in these studies.

Upon near-UV photolysis of dinucleoside monophosphates d(ApA), d(ApC) and d(CpA) in the presence of MQ, the A moiety of dinucleotides undergoes alkylation to corresponding N6-formyl and N6-acetyl modifications of A(24). The mechanism of formation of these products was proposed to involve initial charge transfer followed by deprotonation of A radical cations and attack of adenin-N6-yl radicals onto either the

quinone methide or the intact quinone of MQ. There was no evidence for the formation of stable cross-links in this study. Although MQ and A initially bind together in the process, they eventually come apart by subsequent rearrangements and oxidation steps. Nevertheless, this mechanism requires O<sub>2</sub>, and thus, it can be ruled out in the formation of 2-4 in MQ-DNA duplexes. The difference between the reaction with dinucleotides and that with MQ-DNA duplexes may be attributed to a shorter lifetime of MQ and adenine-N6-yl radicals in the polymer as a result of their close proximity compared to separated radicals in solution. In particular, the short lifetime of MQ radicals in the polymer may limit their ability to react with O<sub>2</sub> and regenerate MQ, which is necessary in the formation of formylated and acetylated products. In the reaction with dinucleotides, MQ radical anions are likely quantitatively transformed back to MQ because they diffuse freely in solution and thereby react rapidly with O<sub>2</sub>.

In summary we have identified the structure of three novel interstrand cross-links arising from the photolysis of MQ tethered oligonucleotides initially designed as a model for charge transfer in DNA. The structure of cross-links was deduced by MS and NMR analyses obtained from products directly isolated from DNA. Two cross-links were isomers in which the exocyclic amino group at N6 of A was attached to C2 of MQ with a saturated 2,3 double bond. These cross-links readily reverted back to starting products permitting the recovery of intact DNA upon heating. The other cross-link consisted of an adduct between A and MQ in which the exocyclic amino group at N6 of A was attached to C3 of MQ. The quinone moiety was intact and the compound was stable. The structure of cross-links was also examined at the nucleoside level in order to produce sufficient amounts for more complete NMR analyses. This work demonstrates the formation of

interstrand cross-links in MQ-DNA duplexes, and underlines the importance of DNA structure on the fate of intermediate MQ and adenine radicals in the formation of cross-links in DNA.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Canadian Institutes of Health Research (MOP-1249) and National Sciences and Engineering Research Council of Canada (to JRW). We are grateful to Prs. Pierre Lavigne and Luc Tremblay for NMR analysis.

### **Supporting Information Available**

<sup>1</sup>H-NMR spectra of MQ-linker-pA (**1**), dAdo, **2b**, **4b**, **3c**, **4c**. ESI-MS/MS spectra of **1**, **4b**, **2c**, **4c**. Formation of **2-4a** under O<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>. HPLC analysis of **2-4b** and **2-4c**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

### Legend of Figures

**Figure 1.** MQ-conjugated and complementary strands.

**Figure 2.** PAGE analysis of MQ-DNA duplexes under denaturing conditions. MQ-DNA duplexes (ODN 1/2) were exposed to near-UV light at 2  $\mu$ M in 10 mM phosphate buffer pH 7.0 with O<sub>2</sub> bubbling followed by piperidine treatment (lane 1 to 4) or no piperidine treatment (lane 5 to 8). Photolysis duration was 0, 30, 60 and 120 min for lanes 1/5, 2/6, 3/7 and 4/8 respectively.

**Figure 3.** HPLC analyses of MQ-DNA duplexes (ODN 1/2). The duplexes were digested with P1 nuclease and alkaline phosphatase. Chromatograms: a) control; b) photolysis with O<sub>2</sub>; c): photolysis with N<sub>2</sub>; d): treated with sodium hydrosulfite; e): treated with cytochrome C reductase/NADH. The separations were achieved using HPLC with method II.

**Figure 4.** Structure of compounds 1-4.

**Figure 5.** HPLC analysis of purified **2a** or **2b** after different treatments. Chromatograms: a) control; b) **2a** heated at 60°C for 30 min; c) **2a** digested with SV phosphodiesterase I + alkaline phosphatase; d) **2b** heated at 60°C for 30 min. Separations were achieved using HPLC with method II.

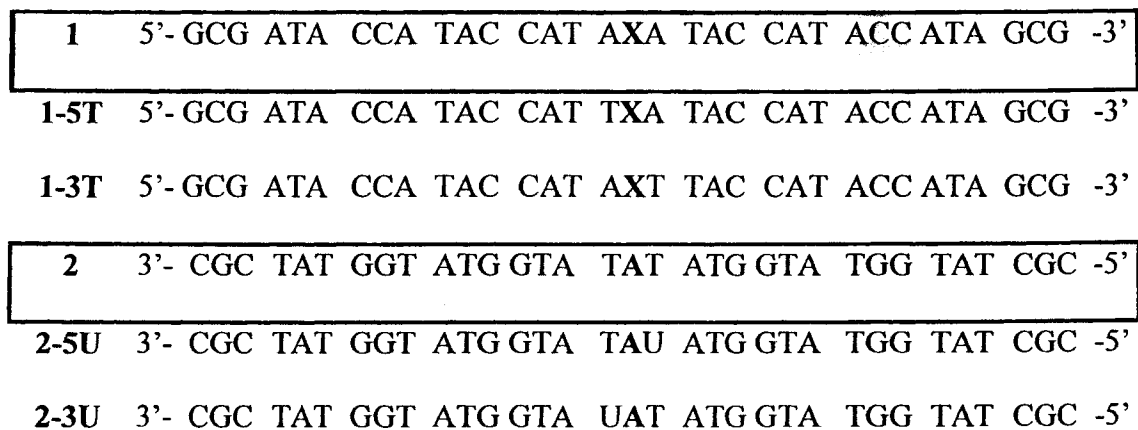


**Figure 6.** HPLC analysis of photolysed and digested MQ-DNA duplexes using alternative sequences. Chromatograms: a) 1+2-3U; b) 1+2-5U; c) 1+2; d) 1-5T+2; e) 1-3T+2. Separations were achieved using HPLC with method II.

**Figure 7.** ESI-MS/MS analysis of  $[M+Na]^+$  ion of **2b** in  $CH_3CN/H_2O/NaCl$  (upper trace) and in  $CH_3CN/D_2O/NaCl$  (bottom trace). Fragmentation induces the recovery of intact MQ-linker and dAdo.

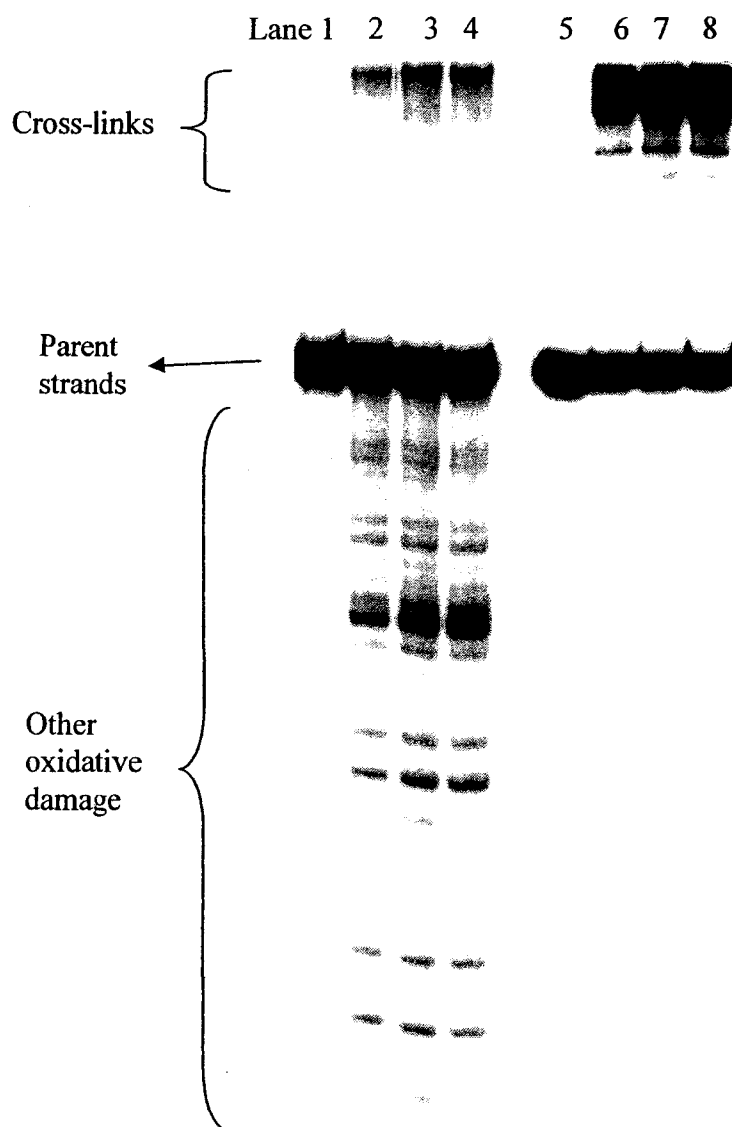
**Figure 8.** Panel A:  $^1H$ -NMR of **3b** in  $D_2O$  with minimal decomposition (10%); Panel B:  $^1H$ -NMR of **3b** after heating the sample for 60 min at  $37^\circ C$ .

**Figure 1.**



where X=MQ. Framed sequences were used for the production of 1-4.

Figure 2



**Figure 3.**

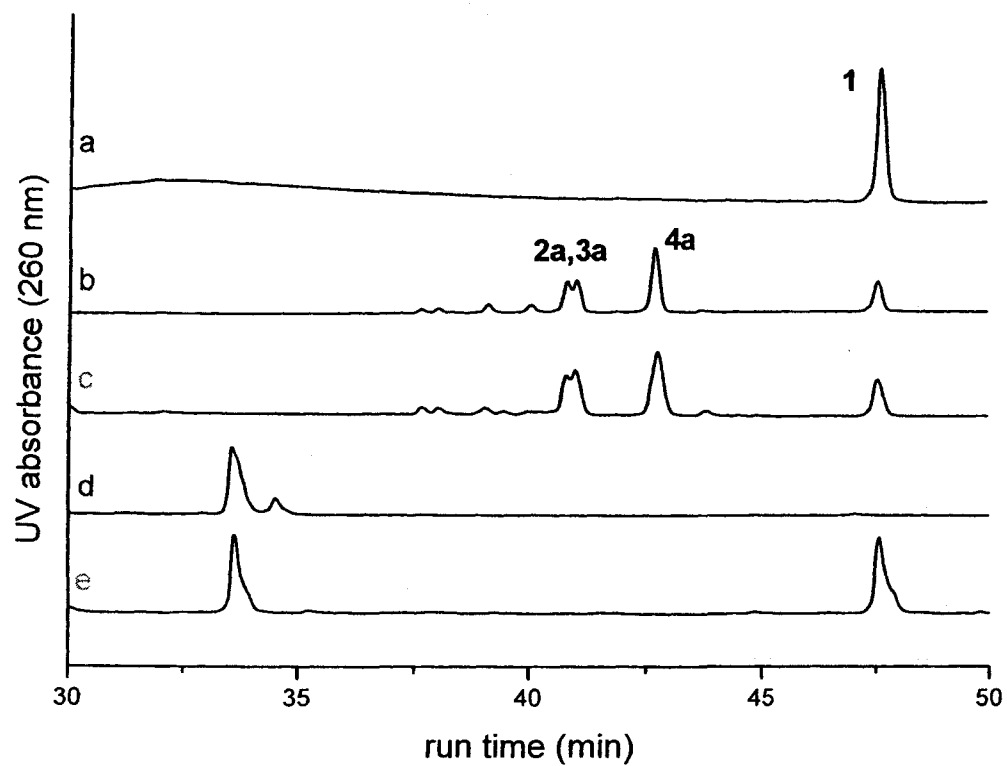
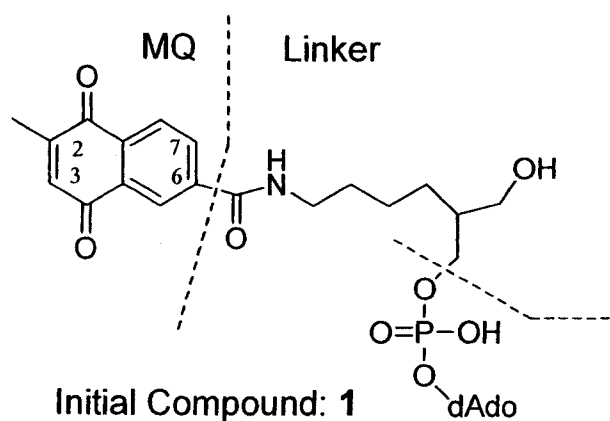
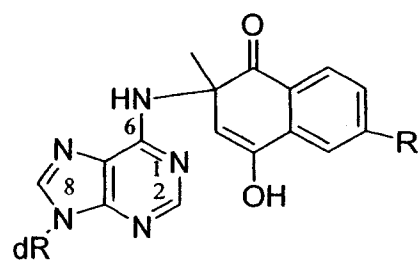


Figure 4.



dAdo-2'-deoxyadenosine  
dR= 2'-deoxyribose  
R= Linker +dA(a); Linker(b); H(c)



Two isomers: **2a,b,c; 3a,b,c**

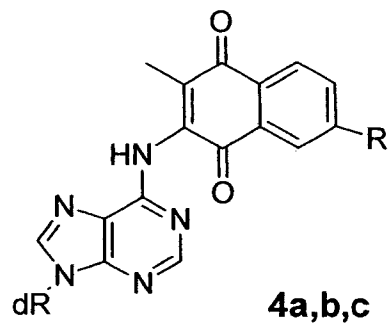


Figure 5.

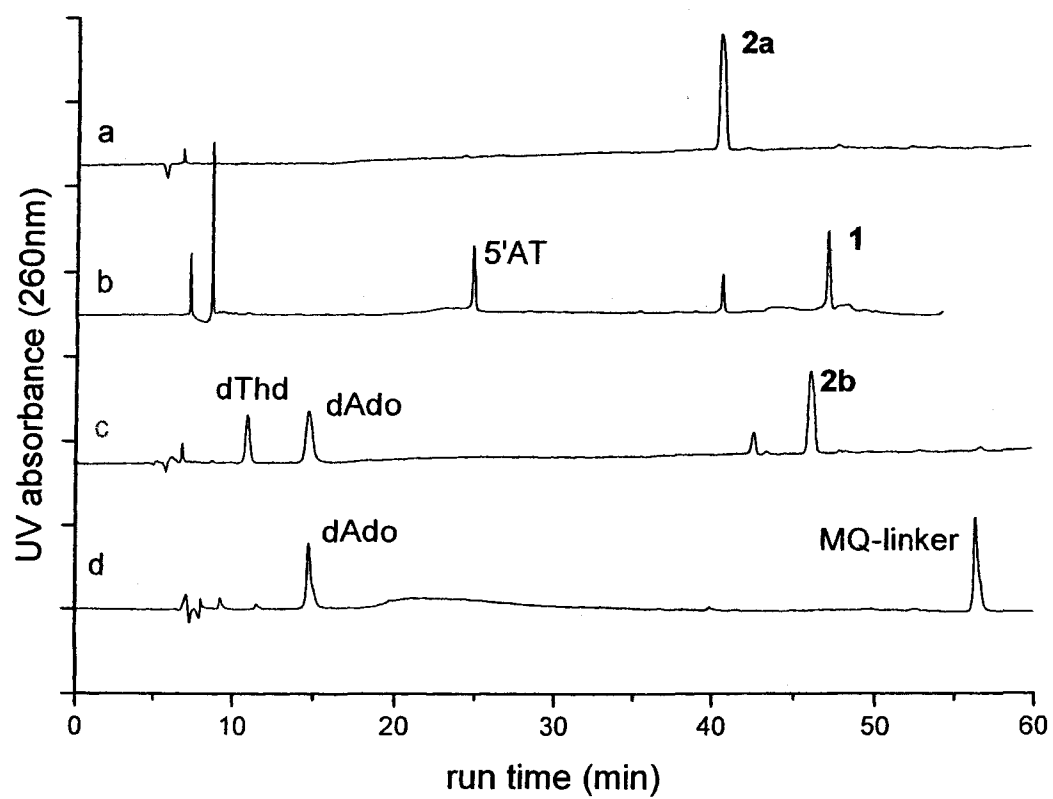


Figure 6.

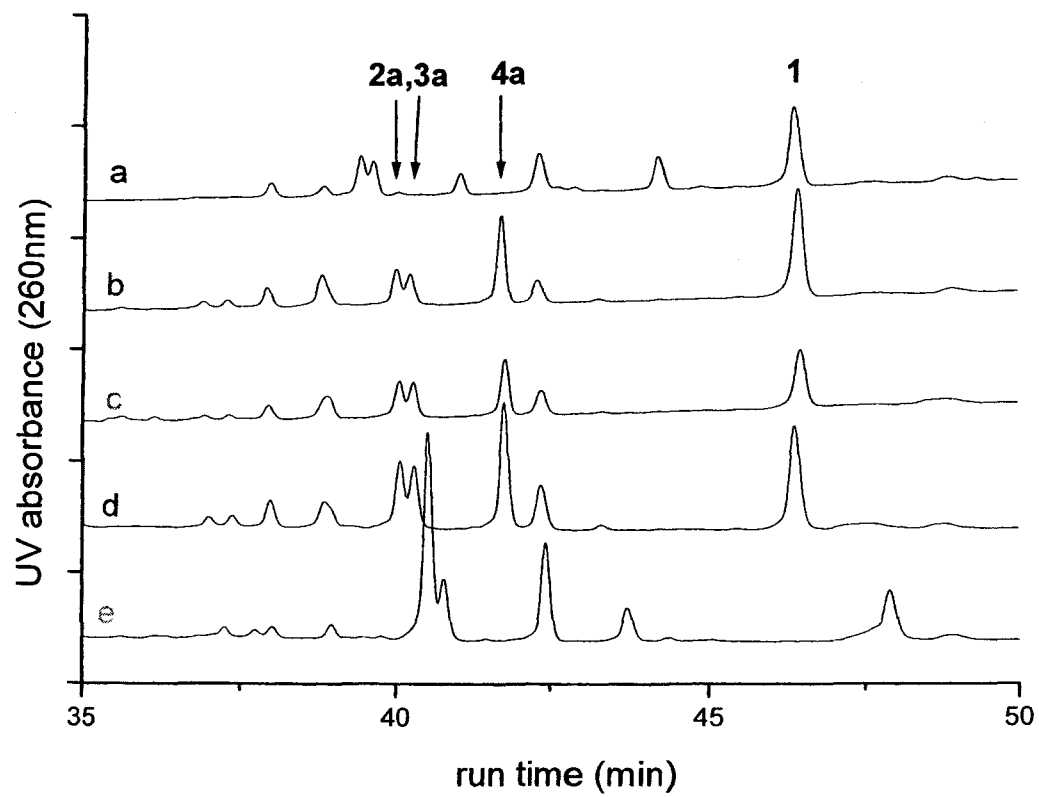


Figure 7.

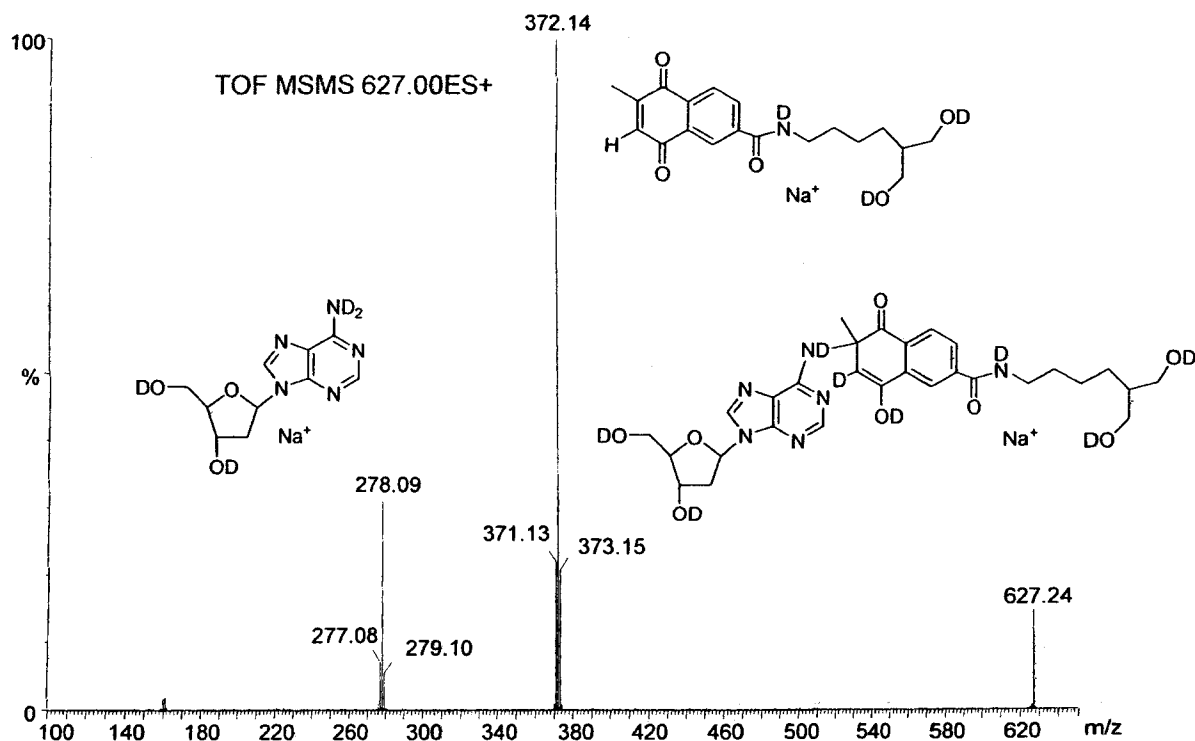
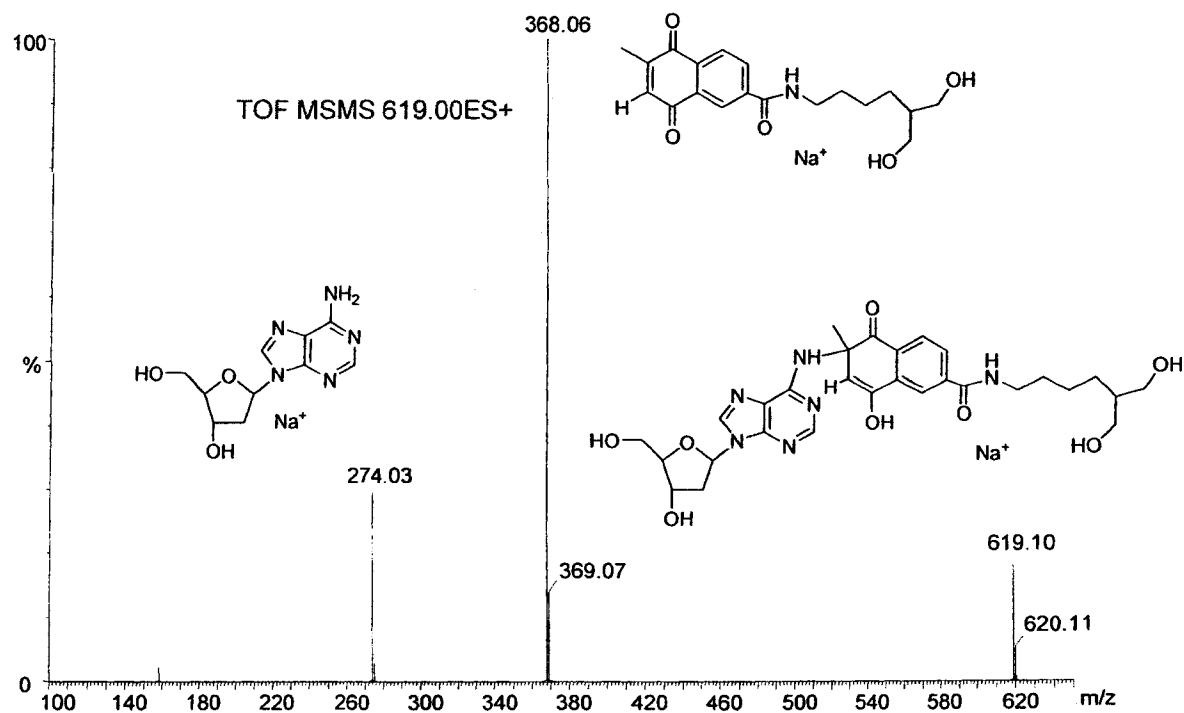
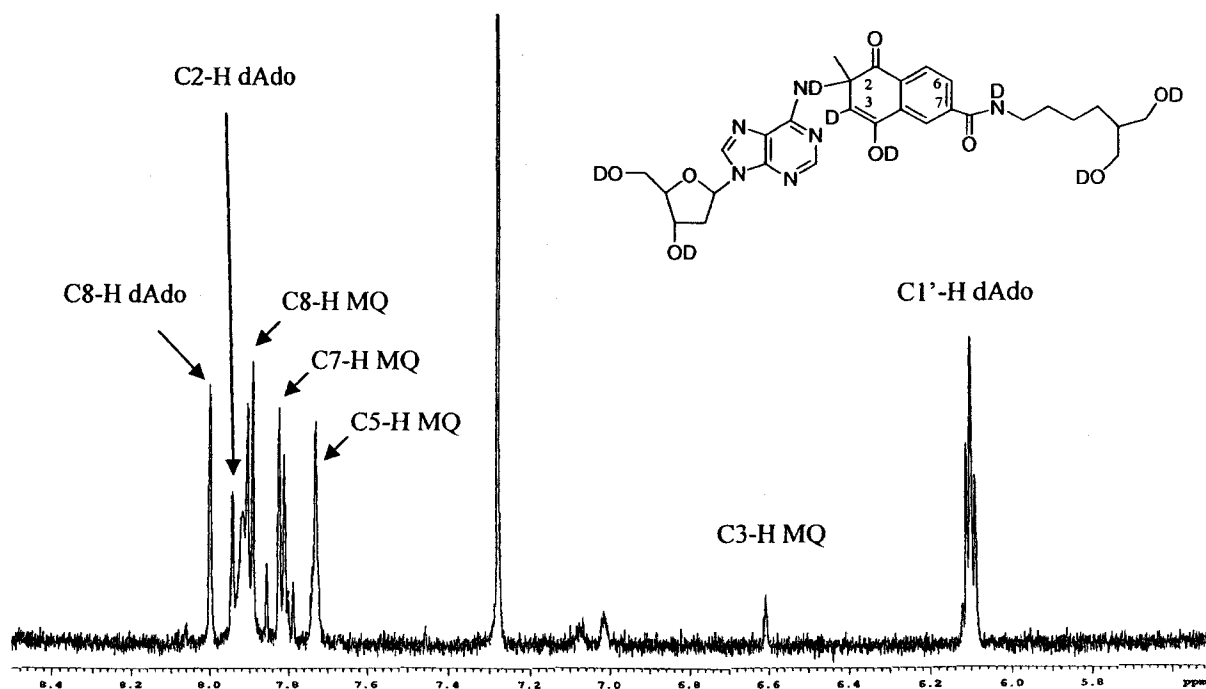


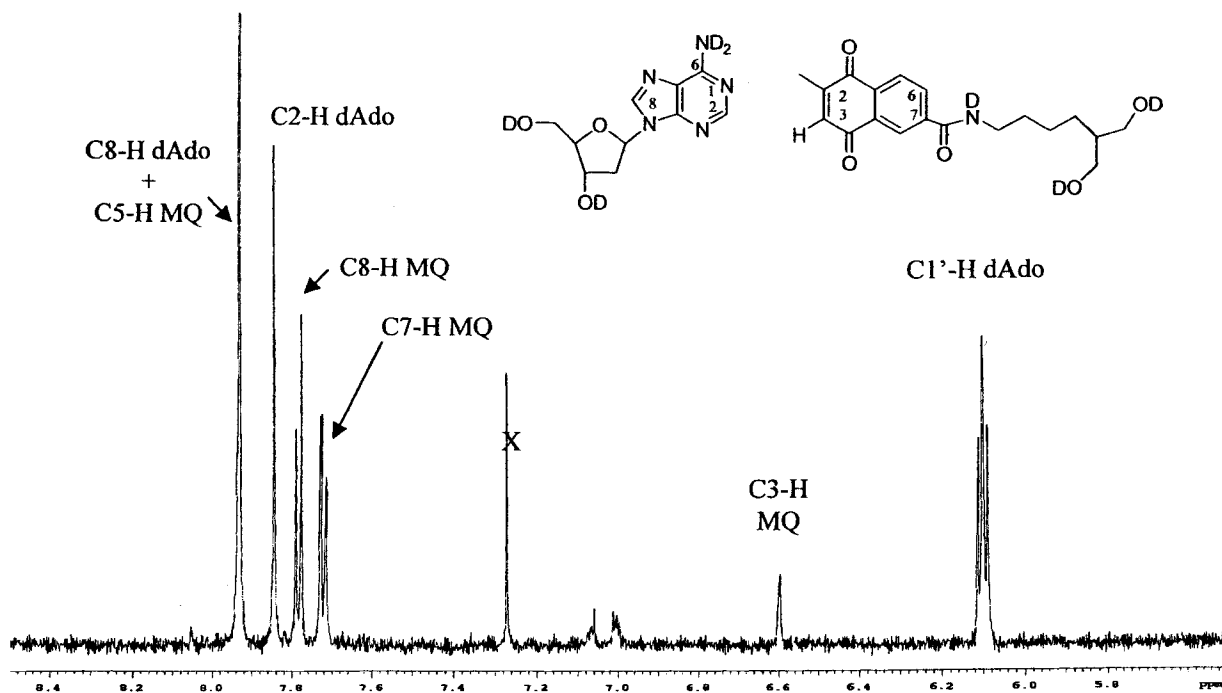


Figure 8.

A



B



**Table 1.** Chemical properties of compounds 1-4.

|              | UV max (nm) | Ratio 260/340 | Retention time (min)              | Yield %            |
|--------------|-------------|---------------|-----------------------------------|--------------------|
| <b>1</b>     | 254/334     | 10.7          | 48 <sup>a</sup>                   | -                  |
| <b>2a</b>    | 264/310     | 52.6          | 41 <sup>a</sup>                   | 20-30 <sup>d</sup> |
| <b>3a</b>    | 264/310     | 52.6          | 41 <sup>a</sup>                   | 20-30 <sup>d</sup> |
| <b>2b/3b</b> | 266/315     | 38.0          | 46 <sup>a</sup> ; 28 <sup>b</sup> | 1-2 <sup>e</sup>   |
| <b>2c/3c</b> | 263/315     | 44.5          | 24 <sup>c</sup>                   | 1-2 <sup>e</sup>   |
| <b>4a</b>    | 265/341     | 11.7          | 43 <sup>a</sup>                   | 20-30 <sup>d</sup> |
| <b>4b</b>    | 274/332     | 6.0           | 29 <sup>b</sup>                   | 1-2 <sup>e</sup>   |
| <b>4c</b>    | 272/334     | 5.5           | 25 <sup>c</sup>                   | 1-2 <sup>e</sup>   |

<sup>a</sup>HPLC with method II (see experimental section)<sup>b</sup>HPLC with method III<sup>c</sup>HPLC with method IV<sup>d</sup>relative to product 1<sup>e</sup>relative to dAdo

**Table 2.**  $^1\text{H}$ -NMR features of compounds **1-4**<sup>a</sup>

|                              | dAdo moiety |      |                   |       | MQ moiety     |      |      |      |      |                 |
|------------------------------|-------------|------|-------------------|-------|---------------|------|------|------|------|-----------------|
|                              | C8-H        | C2-H | N6-H              | C1'-H | C3-H          | C5-H | C6-H | C7-H | C8-H | CH <sub>3</sub> |
| dAdo <sup>b</sup>            | 7.94        | 7.81 | -                 | 6.10  | -             | -    | -    | -    | -    | -               |
| MQ-linker <sup>b</sup>       | -           | -    | -                 | -     | 6.60          | 7.93 | -    | 7.72 | 7.79 | -               |
| <b>3b</b> <sup>b</sup>       | 7.99        | 7.93 | -                 | 6.10  | -             | 7.72 | -    | 7.81 | 7.89 | -               |
| <b>3b</b> +heat <sup>b</sup> | 7.93        | 7.85 | -                 | 6.10  | -             | 7.94 | -    | 7.72 | 7.79 | -               |
| <b>3c</b> <sup>c</sup>       | 7.92        | 7.77 | 7.12 <sup>d</sup> | 6.10  | 4.06<br>/2.96 | 7.72 | 7.57 | 7.57 | 7.82 | 1.41            |
| <b>4b</b> <sup>b</sup>       | 7.95        | 7.90 | -                 | 6.10  | -             | 7.93 | -    | 7.71 | 7.79 | -               |
| <b>4c</b> <sup>c</sup>       | 7.98        | 7.96 | 8.28 <sup>d</sup> | 6.10  | -             | 7.66 | 7.48 | 7.48 | 7.74 | 1.80            |

<sup>a</sup>chemical shifts were calibrated with H1' = 6.10 ppm.<sup>b</sup>in D<sub>2</sub>O<sup>c</sup>in acetone-d<sub>6</sub><sup>d</sup>exchangeable proton upon addition of D<sub>2</sub>O.

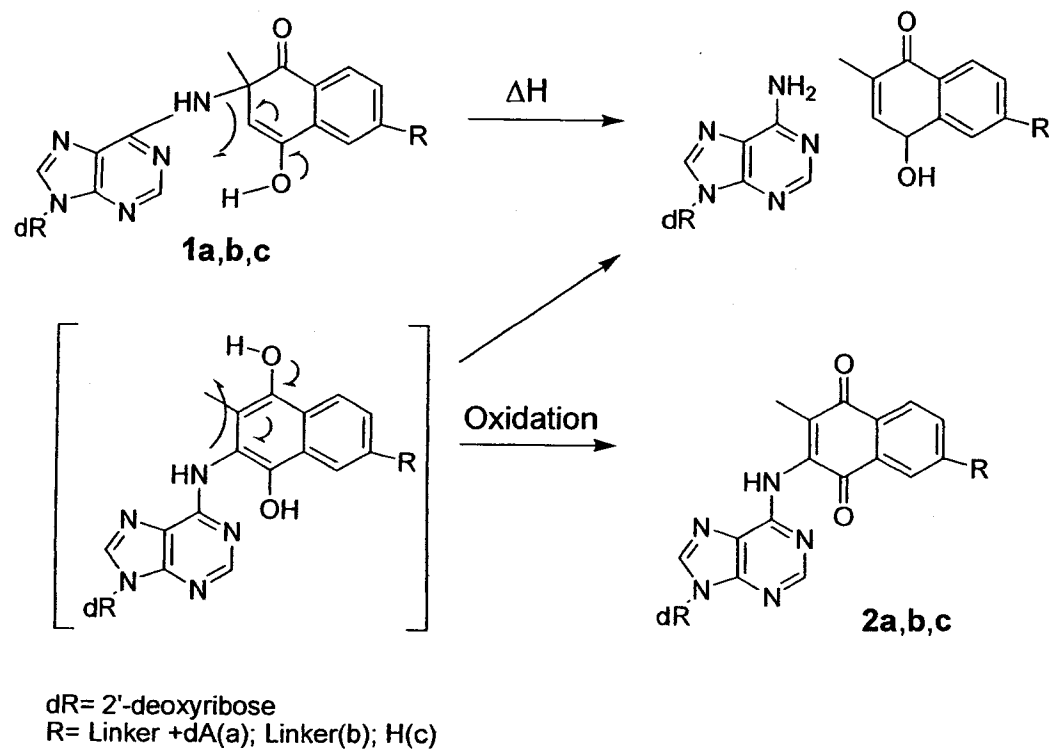
**Legend of Schemes**

**Scheme 1.** Reversal of cross-links to starting products

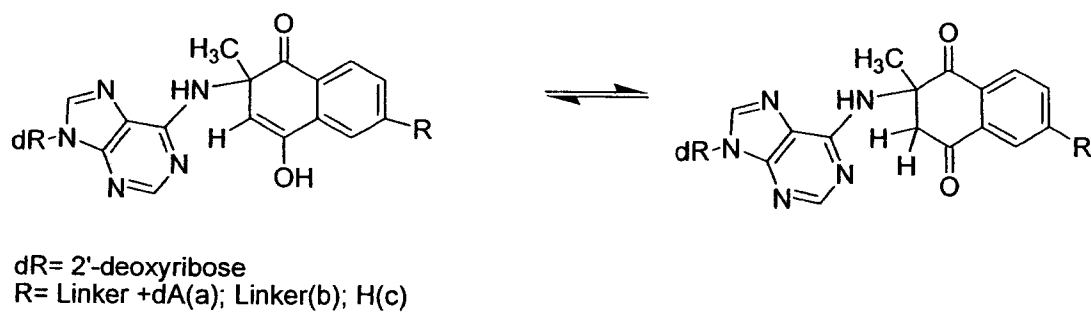
**Scheme 2.** Keto-enol tautomerism of products 2 and 3

**Scheme 3.** Proposed mechanism of formation of interstrand cross-links (2-4)

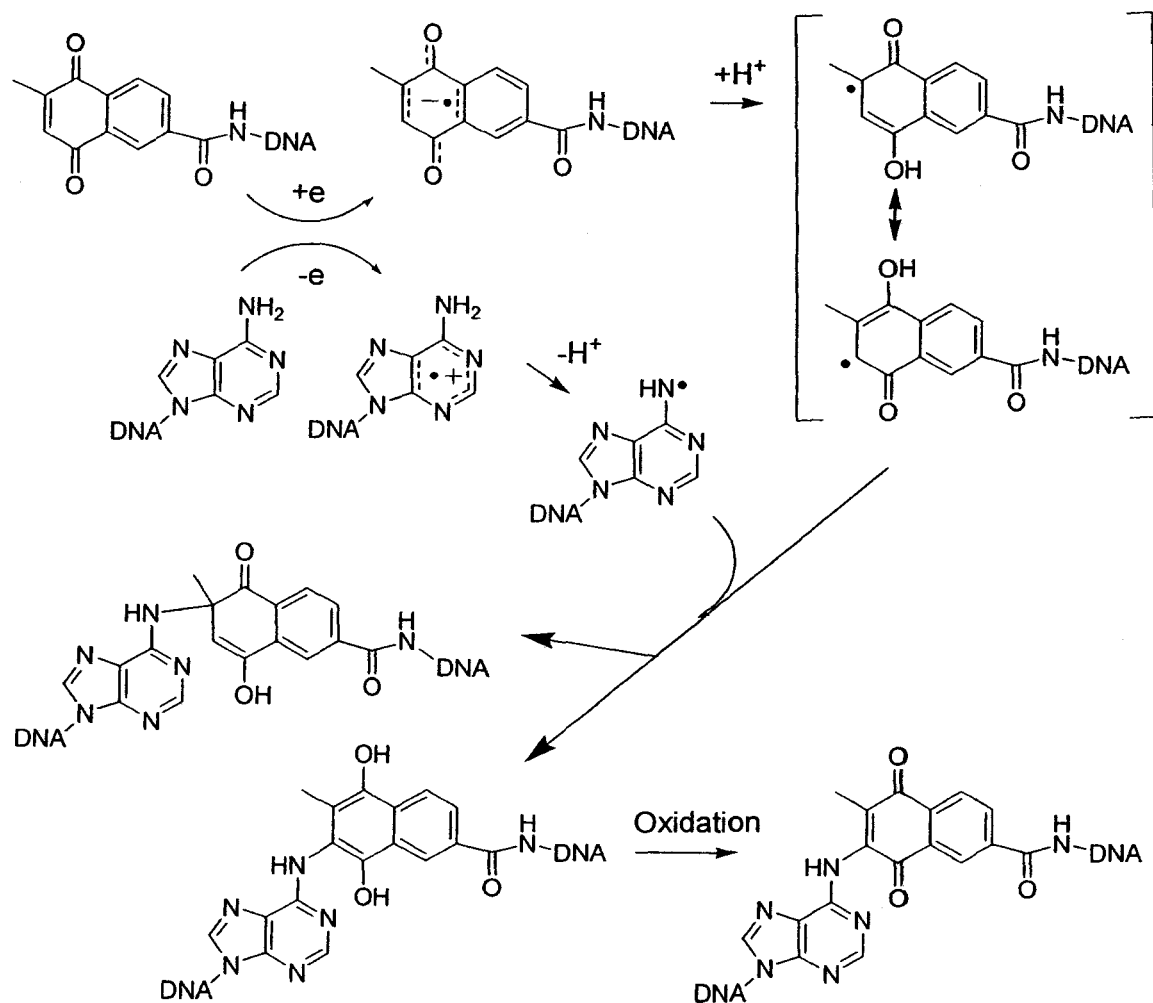
**Scheme 1.**



**Scheme 2.**



Scheme 3.



## References

- (1) Dronkert, M. L. G. and Kanaar, R. (2001) Repair of DNA Interstrand Cross-Links. *Mutat. Res.* 486, 217-247.
- (2) Scharer, O. D. (2005) DNA Interstrand Crosslinks: Natural and Drug-Induced DNA Adducts that Induce Unique Cellular Responses. *Chembiochem.* 6, 27-32.
- (3) Dooley, P. A., Tsarouhtsis, D., Korbel, G. A., Nechev, L. V., Shearer, J., Zegar, I. S., Harris, C. M., Stone, M. P. and Harris, T. M. (2001) Structural Studies of an Oligodeoxynucleotide Containing a Trimethylene Interstrand Cross-Link in a 5'-(CpG) Motif: Model of a Malondialdehyde Cross-Link. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 1730-1739.
- (4) Noronha, A. M., Noll, D. M. and Miller, P. S. (2001) Syntheses of DNA Duplexes Containing a C-C Interstrand Cross-Link. *Nucleoside Nucleotide Nucleic Acids.* 20, 1303-1307.
- (5) Dunham, S. U., Chifotides, H. T., Mikulski, S., Burr, A. E. and Dunbar, K. R. (2005) Covalent Binding and Interstrand Cross-Linking of Duplex DNA by Dirhodium(II,II) Carboxylate Compounds. *Biochemistry.* 44, 996-1003.
- (6) Cecchini, S., Girouard, S., Huels, M. A., Sanche, L. and Hunting, D. J. (2005) Interstrand Cross-Links: A New Type of Gamma-Ray Damage in Bromodeoxyuridine-Substituted DNA. *Biochemistry.* 44, 1932-1940.
- (7) Halila, S., Velasco, T., De Clercq, P. and Madder, A. (2005) Fine-Tuning Furan Toxicity: Fast and Quantitative DNA Interchain Crosslink Formation upon Selective Oxidation of a Furan Containing Oligonucleotide. *Chem. Commun.*, 936-938.
- (8) Ossipov, D., Gohil, S. and Chattopadhyaya, J. (2002) Synthesis of the DNA-[Ru(Tpy)(Dppz)(CH<sub>3</sub>CN)](2+) Conjugates and their Photo Cross-Linking Studies with the Complementary DNA Strand. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 13416-13433.
- (9) Lentzen, O., Defrancq, E., Constant, J. F., Schumm, S., Garcia-Fresnadillo, D., Moucheron, C., Dumy, P. and Kirsch-De Mesmaeker, A. (2004) Determination of DNA Guanine Sites Forming Photo-Adducts with Ru(II)-Labeled Oligonucleotides; DNA Polymerase Inhibition by the Resulting Photo-Crosslinking. *J. Biol. Inorg. Chem.* 9, 100-108.
- (10) Yoshimura, Y., Ito, Y. and Fujimoto, K. (2005) Interstrand Photocrosslinking of DNA via p-Carbamoylvinyl Phenol Nucleoside. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 1299-1301.

- (11) Nakatani, K., Yoshida, T. and Saito, I. (2002) Photochemistry of Benzophenone Immobilized in a Major Groove of DNA: Formation of Thermally Reversible Interstrand Cross-Link. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 2118-2119.
- (12) Hong, I. S. and Greenberg, M. M. (2005) Efficient DNA Interstrand Cross-Link Formation from a Nucleotide Radical. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 3692-3693.
- (13) Lamson, D. W. and Plaza, S. M. (2003) The Anticancer Effects of Vitamin K. *Altern. Med. Rev.* 8, 303-318.
- (14) Warren, M. C., Bump, E. A., Medeiros, D. and Braunhut, S. J. (2000) Oxidative Stress-Induced Apoptosis of Endothelial Cells. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 537-547.
- (15) Ibuki, Y., Toyooka, T. and Goto, R. (2006) Inhibition of Apoptosis by Menadione on Exposure to UVA. *Cell Biol Toxicol.* 22, 351-360.
- (16) Okayasu, H., Ishihara, M., Satoh, K. and Sakagami, H. (2001) Cytotoxic Activity of Vitamins K-1, K-2 and K-3 Against Human Oral Tumor Cell Lines. *Anticancer Res.* 21, 2387-2392.
- (17) McAmis, W. C., Schaeffer, R. C., Baynes, J. W. and Wolf, M. B. (2003) Menadione Causes Endothelial Barrier Failure by a Direct Effect Onintracellular Thiols, Independent of Reactive Oxidant Production. *Biochim. Biophys.* 1641, 43-53.
- (18) McCormick, M. L., Denning, G. M., Reszka, K. J., Bilski, P., Buettner, G. R., Rasmussen, G. T., Railsback, M. A. and Britigan, B. E. (2000) Biological Effects of Menadione Photochemistry: Effects of Menadione on Biological Systems may Not Involve Classical Oxidant Production. *Biochem. J.* 350, 797-804.
- (19) Scott, G. K., Atsriku, C., Kaminker, P., Held, J., Gibson, B., Baldwin, M. A. and Benz, C. C. (2005) Vitamin K3 (Menadione)-Induced Oncosis Associated with Keratin 8 Phosphorylation and Histone H3 Arylation. *Mol. Pharmacol.* 68, 606-615.
- (20) Zeng, Q. P. and Rokita, S. E. (1996) Tandem Quinone Methide Generation for Cross-Linking DNA. *J. Org. Chem.* 61, 9080-9081.
- (21) Richter, S. N., Maggi, S., Mels, S. C., Palumbo, M. and Freccero, M. (2004) Binol Quinone Methides as Bisalkylating and DNA Cross-Linking Agents. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 13973-13979.
- (22) Chatterjee, M. and Rokita, S. E. (1990) Inducible Alkylation of Dna using an Oligonucleotide Quinone Conjugate. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 6397-6399.
- (23) Chatterjee, M. and Rokita, S. E. (1994) The Role of a Quinone Methide in the Sequence-Specific Alkylation of Dna. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 1690-1697.



- (24) Wang, Y. S. and Liu, Z. J. (2002) Mechanisms for the Formation of Major Oxidation Products of Adenine upon 365-Nm Irradiation with 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone as a Sensitizer. *J. Org. Chem.* 67, 8507-8512.
- (25) Wang, Y. S., Liu, Z. J. and Dixon, C. (2002) Major Adenine Products from 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone-Sensitized Photoirradiation at 365 Nm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 1252-1257.
- (26) Melvin, T., Bothe, E. and SchulteFrohlinde, D. (1996) The Reaction of Triplet 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone (Menadione) with DNA and Polynucleotides. *Photochem. Photobiol.* 64, 769-776.
- (27) Williams, T. T., Dohno, C., Stemp, E. D. A. and Barton, J. K. (2004) Effects of the Photooxidant on DNA-Mediated Charge Transport. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 8148-8158.
- (28) Giese, B. (2004) Hole Injection and Hole Transfer through DNA: The Hopping Mechanism. *Long-Range Charge Transfer in Dna i.* 236, 27-44.
- (29) Liu, C. S., Hernandez, R. and Schuster, G. B. (2004) Mechanism for Radical Cation Transport in Duplex DNA Oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 2877-2884.
- (30) Bergeron, F., Houde, D., Hunting, D. J. and Wagner, J. R. (2004) Electron Transfer in DNA Duplexes Containing 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone. *Nucleic Acids Res.* 32, 6154-6163.
- (31) Fisher, G. J. and Land, E. J. (1983) Photosensitization of Pyrimidines by 2-Methylnaphthoquinone in Water: A Laser Flash Photolysis Study. *Photochem Photobiol.* 37, 27-32.
- (32) Decarroz, C., Wagner, J. R., van Lier, J. E., Krishna, C. M., Riesz, P. and Cadet, J. (1986) Sensitized Photo-Oxidation of Thymidine by 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone. Characterization of the Stable Photoproducts. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 50, 491-505.
- (33) Decarroz, C., Wagner, J. R. and Cadet, J. (1987) Specific Deprotonation Reactions of the Pyrimidine Radical Cation Resulting from the Menadione Mediated Photosensitization of 2'-Deoxycytidine. *Free Radic Res Commun.* 2, 295-301.
- (34) Krishna, C. M., Decarroz, C., Wagner, J. R., Cadet, J. and Riesz, P. (1987) Menadione Sensitized Photooxidation of Nucleic-Acid and Protein Constituents - an Electron-Spin-Resonance and Spin-Trapping Study. *Photochem. Photobiol.* 46, 175-182.
- (35) Wagner, J. R., van Lier, J. E. and Johnston, L. J. (1990) Quinone Sensitized Electron Transfer Photooxidation of Nucleic Acids: Chemistry of Thymine and Thymidine Radical Cations in Aqueous Solution. *Photochem Photobiol.* 52, 333-343.

- (36) Wagner, J. R., van Lier, J. E., Decarroz, C., Berger, M. and Cadet, J. (1990) Photodynamic Methods for Oxy Radical-Induced DNA Damage. *Methods Enzymol.* 186, 502-511.
- (37) Wagner, J. R., Hu, C. C. and Ames, B. N. (1992) Endogenous Oxidative Damage of Deoxycytidine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 3380-3384.
- (38) Wagner, J. R., Vanlier, J. E., Berger, M. and Cadet, J. (1994) Thymidine Hydroperoxides - Structural Assignment, Conformational Features, and Thermal-Decomposition in Water. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 2235-2242.
- (39) Bienvenu, C., Wagner, J. R. and Cadet, J. (1996) Photosensitized Oxidation of 5-Methyl-2'-Deoxycytidine by 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone: Characterization of 5-(Hydroperoxymethyl)-2'-Deoxycytidine and Stable Methyl Group Oxidation Products. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 11406-11411.
- (40) Wagner, J. R., Decarroz, C., Berger, M. and Cadet, J. (1999) Hydroxyl-Radical-Induced Decomposition of 2'-Deoxycytidine in Aerated Aqueous Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 4101-4110.
- (41) Weinfeld, M. and Soderlind, K. J. (1991) 32P-Postlabeling Detection of Radiation-Induced DNA Damage: Identification and Estimation of Thymine Glycols and Phosphoglycolate Termini. *Biochemistry.* 30, 1091-1097.
- (42) Wang, Y. S. (2002) HPLC Isolation and Mass Spectrometric Characterization of Two Isomers of Thymine Glycols in Oligodeoxynucleotides. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 671-676.
- (43) Sugiyama, H., Tsutsumi, Y. and Saito, I. (1990) Highly Sequence Selective Photoreaction of 5-Bromouracil-Containing Deoxyhexanucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 6720-6721.
- (44) Waske, P. A., Mattay, J. and Oelgemoller, M. (2006) Photoacylations of 2-Substituted 1,4-Naphthoquinones: A Concise Access to Biologically Active Quinonoid Compounds. *Tetrahedron Lett.* 47, 1329-1332.
- (45) Wagner, J. R., Vanlier, J. E. and Johnston, L. J. (1990) Quinone Sensitized Electron-Transfer Photooxidation of Nucleic-Acids - Chemistry of Thymine and Thymidine Radical Cations in Aqueous-Solution. *Photochem. Photobiol.* 52, 333-343.
- (46) Liu, Z. J., Gao, Y. and Wang, Y. S. (2003) Identification and Characterization of a Novel Cross-Link Lesion in d(CpC) upon 365-Nm Irradiation in the Presence of 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone. *Nucleic Acids Res.* 31, 5413-5424.
- (47) Liu, Z. J., Gao, Y., Zeng, Y., Fang, F., Chi, D. and Wang, Y. S. (2004) Isolation and Characterization of a Novel Cross-Link Lesion in d(CpC) Induced by One-Electron Photooxidation. *Photochem. Photobiol.* 80, 209-215.

- (48) Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Brochier, M. C. and Cadet, J. (1998) A Novel Vicinal Lesion obtained from the Oxidative Photosensitization of TpdG: Characterization and Mechanistic Aspects. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1005-1013.
- (49) Hayon, E. and Simic, M. (1973) Addition of Hydroxyl Radicals to Pyrimidine Bases and Electron Transfer Reactions of Intermediates to Quinones. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 1029-1035.
- (50) Steenken, S. (1989) Purine-Bases, Nucleosides, and Nucleotides - Aqueous-Solution Redox Chemistry and Transformation Reactions of their Radical Cations and E- and Oh Adducts. *Chem. Rev.* **89**, 503-520.
- (51) Sengupta, T., Choudhury, S. D. and Basu, S. (2004) Medium-Dependent Electron and H Atom Transfer between 2'-Deoxyadenosine and Menadione: A Magnetic Field Effect Study. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10589-10593.
- (52) Naruta, Y. and Maruyama, K. (1979) Regio- and Stereocontrolled Polyprenylation of Quinones. A New Synthetic Method of Vitamin K Series. *Chem. Lett.*, 881-884.
- (53) Kim, H. Y. H., Finneman, J. I., Harris, C. M. and Harris, T. M. (2000) Studies of the Mechanisms of Adduction of 2'-Deoxyadenosine with Styrene Oxide and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Dihydrodiol Epoxides. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 625-637.
- (54) Evangelista, F. A., Paul, A. and Schaefer, H. F. (2004) Radicals Derived from Adenine: Prediction of Large Electron Affinities with a Considerable Spread. *J. Phys. Chem. A* **108**, 3565-3571.
- (55) Bruce, J. M. (1967) Light-Induced Reactions of Quinones. *Quart. Rev.* **21**, 405-428.
- (56) Antonini, I., Lin, T. S., Cosby, L. A., Dai, Y. R. and Sartorelli, A. C. (1982) 2- and 6-Methyl-1,4-Naphthoquinone Derivatives as Potential Bioreductive Alkylating Agents. *J. Med. Chem.* **25**, 730-735.
- (57) Yamada, H., Tanabe, K. and Nishimoto, S. (2005) Cleavage at 5-Methylcytosine in DNA by Photosensitized Oxidation with 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone Tethered Oligodeoxynucleotides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 665-668.

**Supporting information: Near-UV photolysis of 2-methyl-1,4-naphthoquinone -DNA duplexes: Characterization of reversible and stable interstrand cross-links between quinone and adenine moieties.**

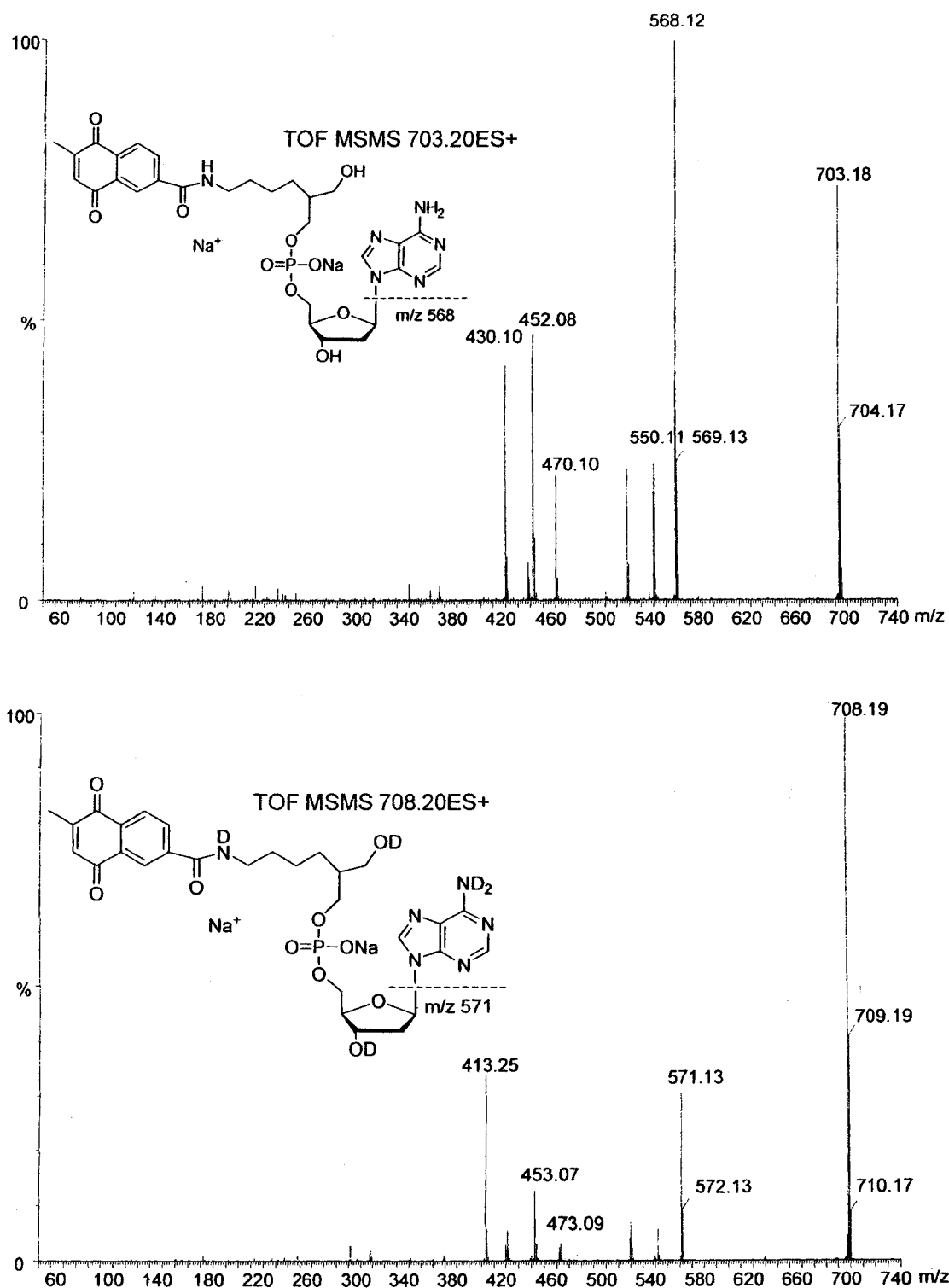
Francois Bergeron, Klaus Klarskov, Darel J. Hunting, and J. Richard Wagner\*

Group in the Radiation Sciences and Mass Spectrometry Laboratory, Department of Pharmacology, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1H 4N5.

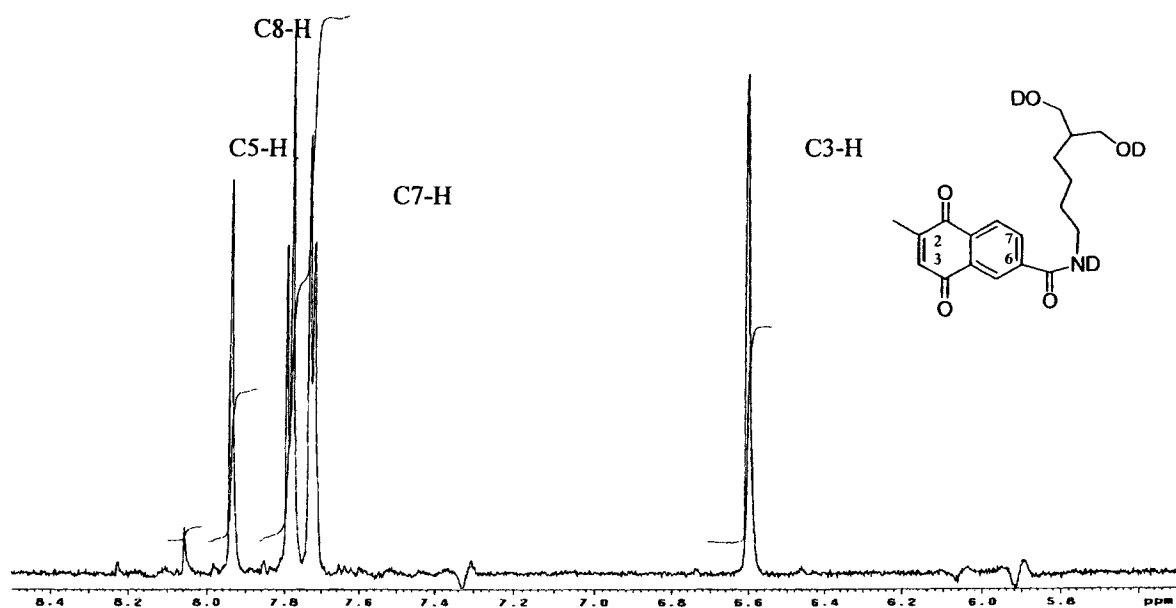
**Legend of Figures (Supporting information):**

- S1. Figure 1.** ESI-MS/MS of **1** in non-deuterated solvent (upper trace) and deuterated solvent (bottom trace).
- S2. Figure 2.**  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of MQ-linker in  $\text{D}_2\text{O}$ .
- S3. Figure 3.** Comparison of photolysis in  $\text{O}_2$  and  $\text{N}_2$ .
- S4. Figure 4.**  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of dAdo in  $\text{D}_2\text{O}$ .
- S5. Figure 5.**  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of product **2b** in  $\text{D}_2\text{O}$ .
- S6. Figure 6.** ESI-MS/MS product **4b** in non-deuterated solvent (upper trace) and deuterated solvent (bottom trace).
- S7. Figure 7.**  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of product **4b** in  $\text{D}_2\text{O}$ .
- S8. Figure 8.** Co-elution of products from dry film and from DNA.
- S9. Figure 9.** ESI-MS/MS of product **2c** in non-deuterated solvent (upper) and deuterated solvent (bottom).
- S10. Figure 10.**  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of product **3c** in acetone- $\text{d}_6$ .
- S11. Figure 11.** ESI-MS/MS of product **4c** in non-deuterated solvent (upper trace) and deuterated solvent (bottom trace).
- S12. Figure 12.**  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of product **4c** in acetone- $\text{d}_6$ .

**S1. Figure 1.** ESI-MS/MS of **1** in non-deuterated solvent (upper trace) and deuterated solvent (bottom trace).



S2. Figure 2.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of MQ-linker in  $\text{D}_2\text{O}$ .



S3. Figure 3. Comparison of photolysis in O<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>.

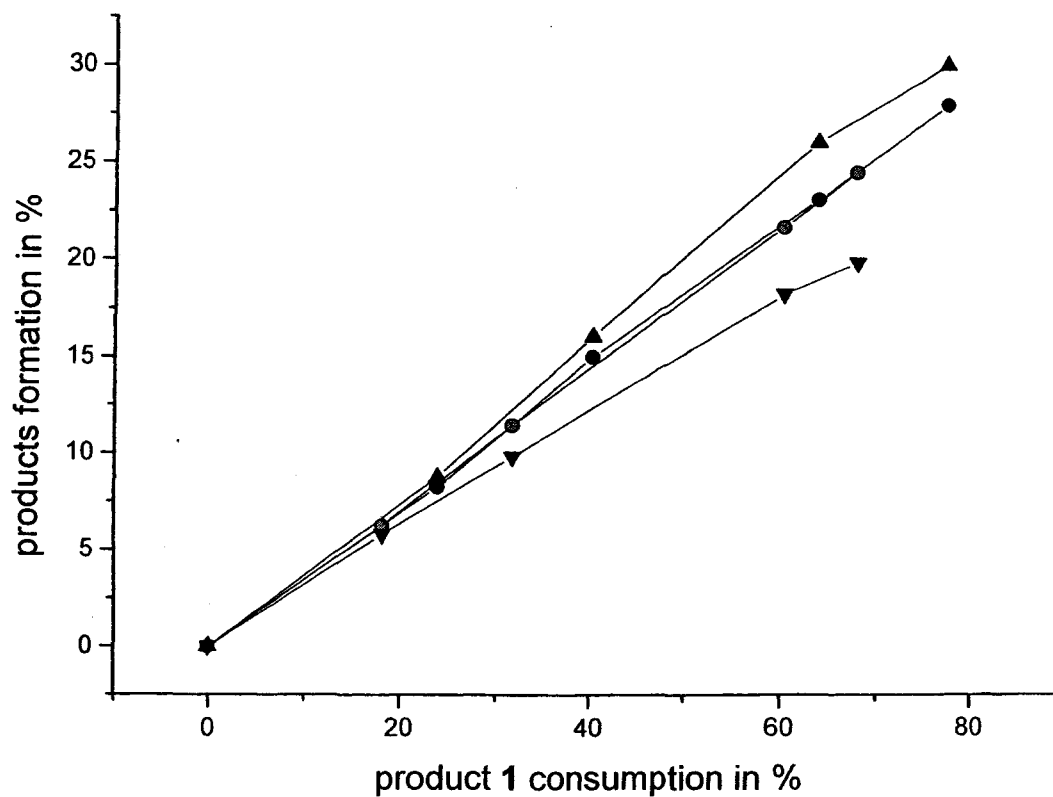
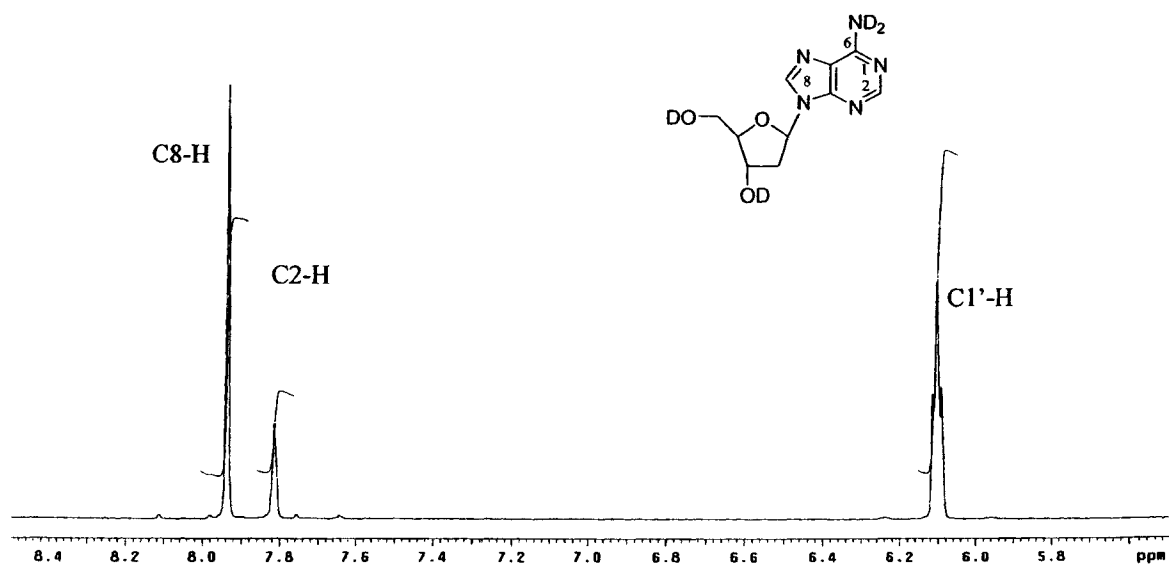


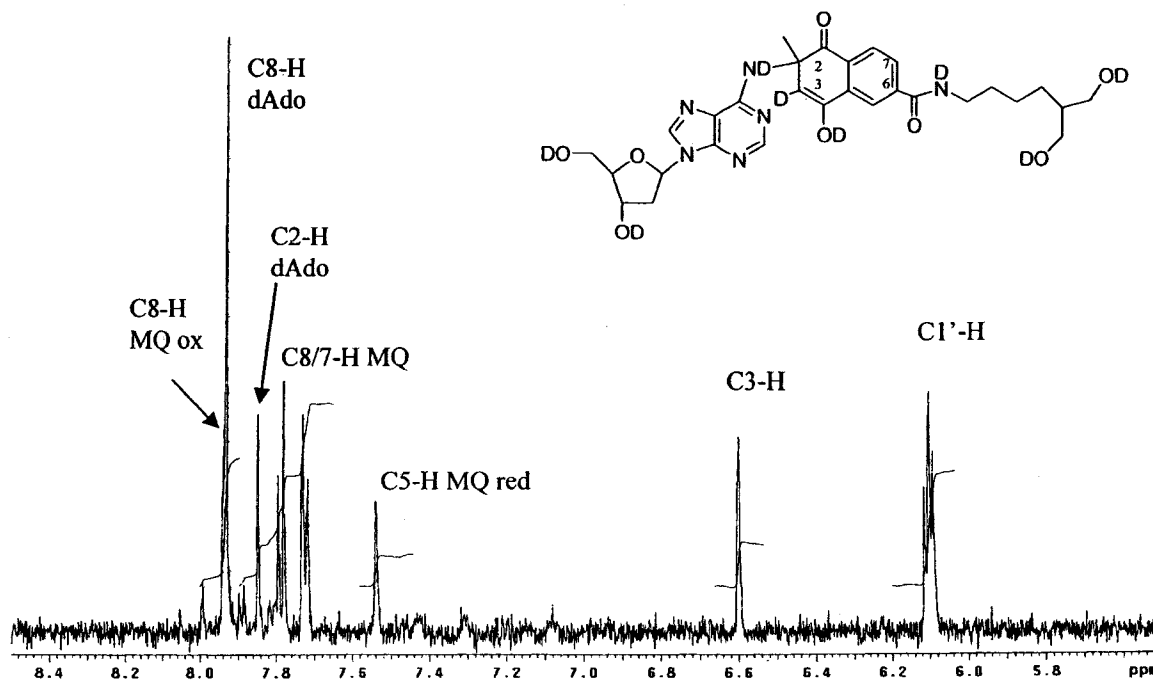
Figure 3. Comparison of photolysis in O<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>. Formation of the tetramers **2a**, **3a**, **4a** relative to the consumption of **1**. Circles: **2a** plus **3a** in O<sub>2</sub> (black), in N<sub>2</sub> (green), triangles: **4a**, in O<sub>2</sub> (red), in nitrogen (blue). Percentage (%) was calculated from the absorbance taken from HPLC analysis using method II.

S4. Figure 4.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of dAdo in  $\text{D}_2\text{O}$ .

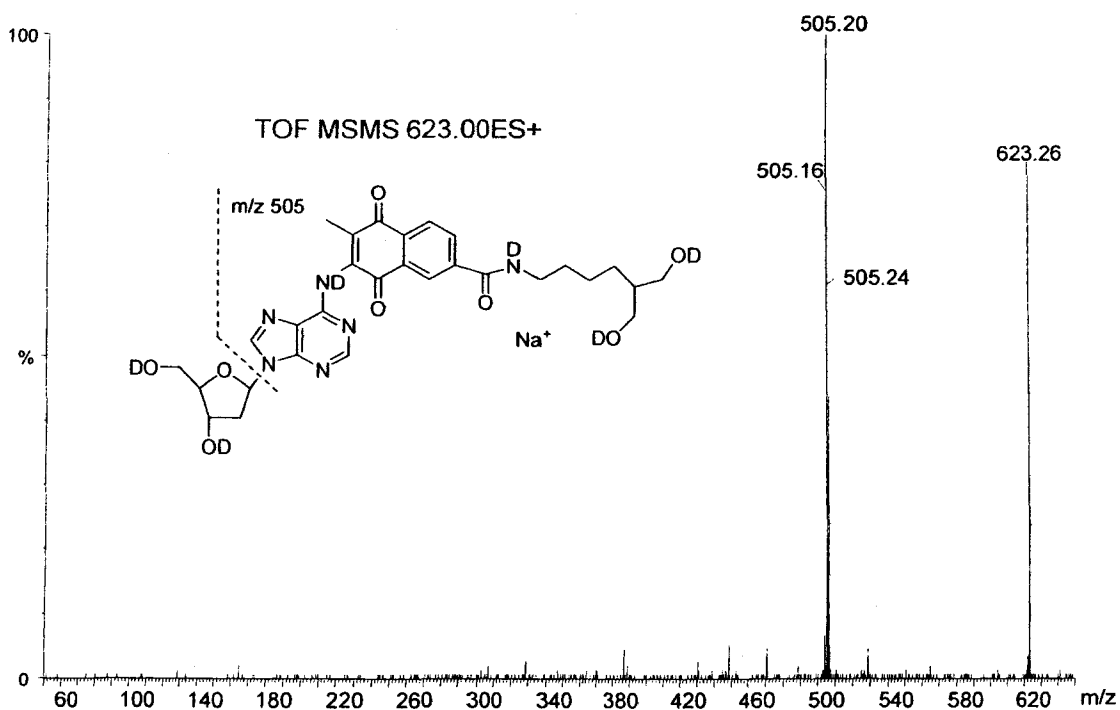
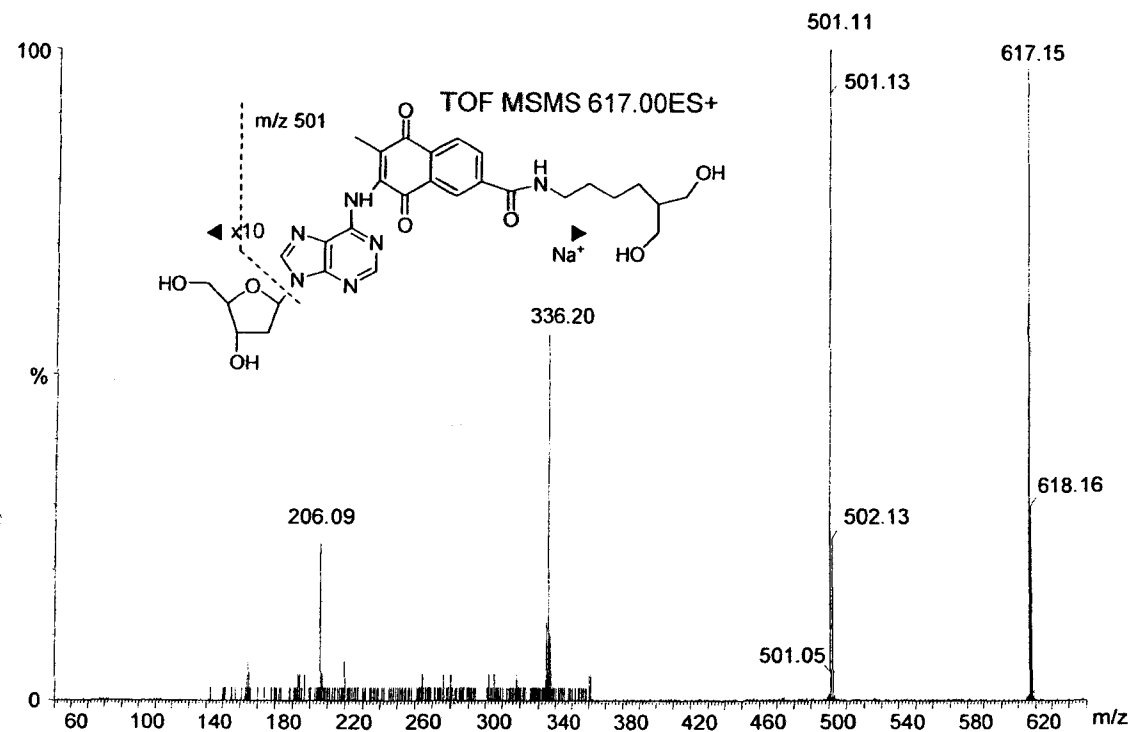




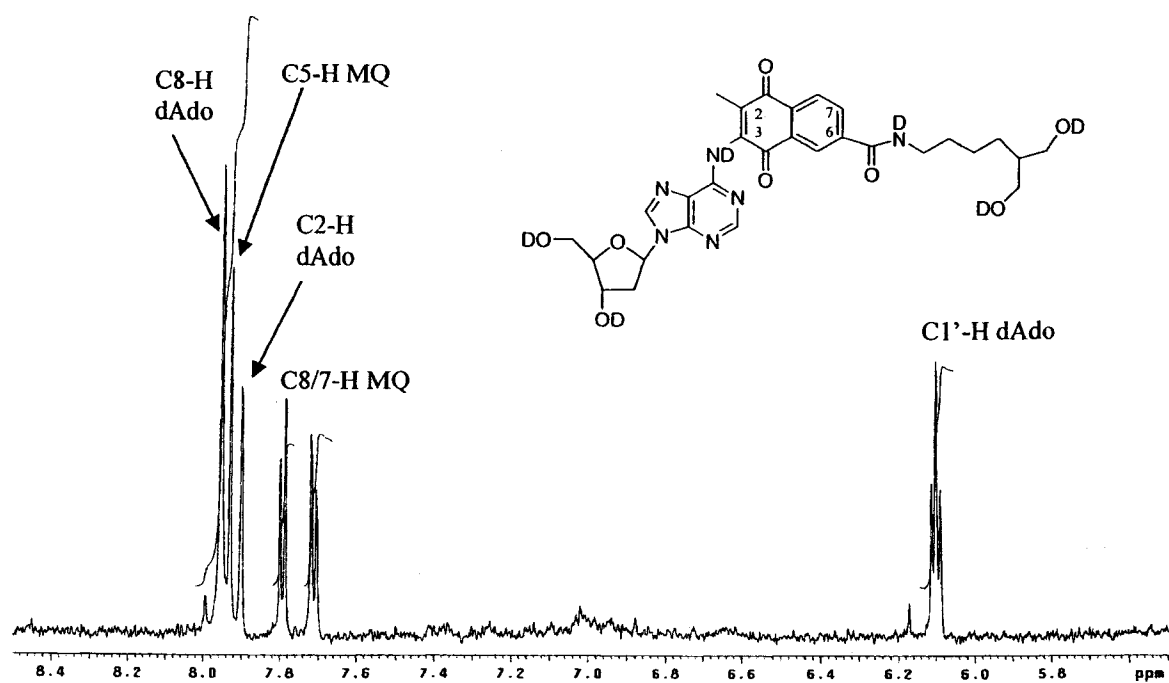
S5. Figure 5.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of product **2b** in  $\text{D}_2\text{O}$



**S6. Figure 6.** ESI-MS/MS product **4b** in non-deuterated solvent (upper trace) and deuterated solvent (bottom trace).



S7. Figure 7.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of product **4b** in  $\text{D}_2\text{O}$ .



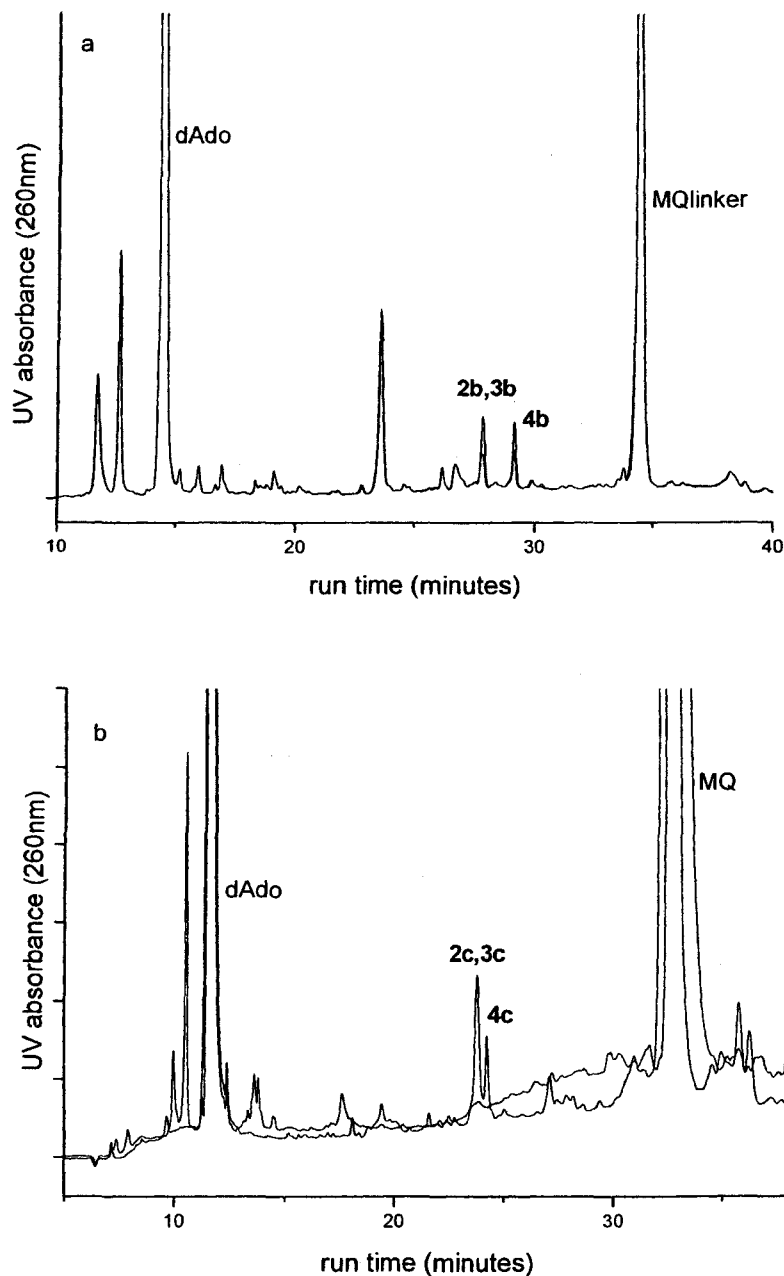
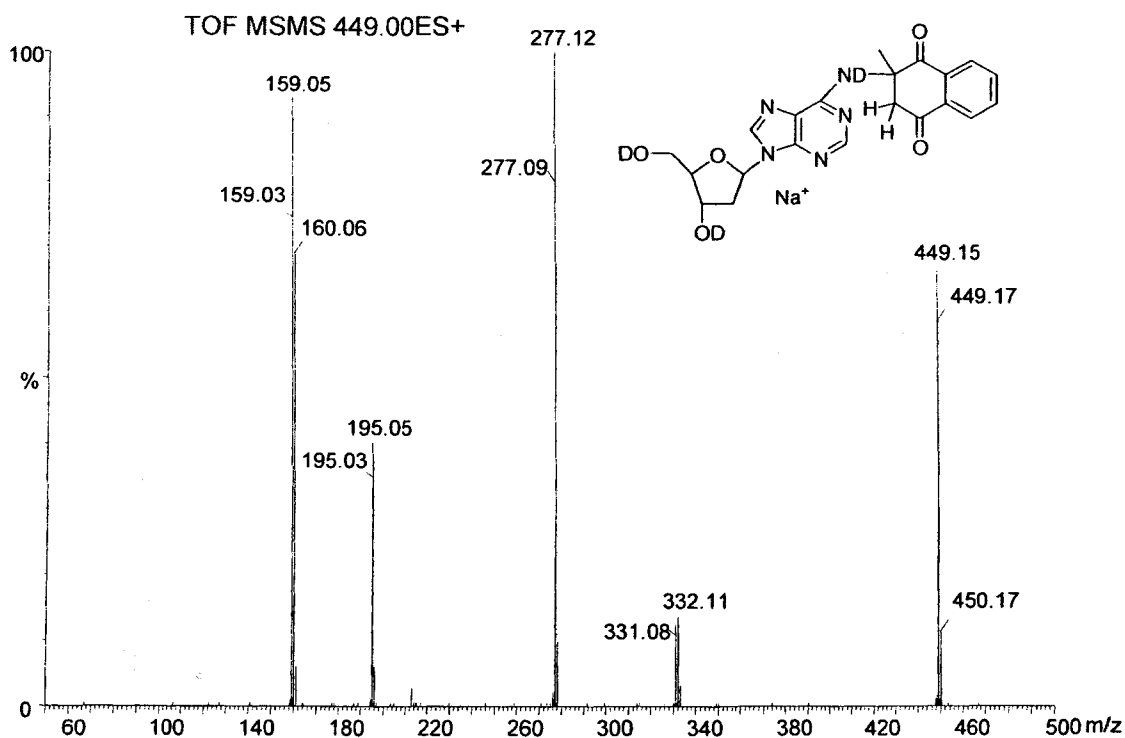
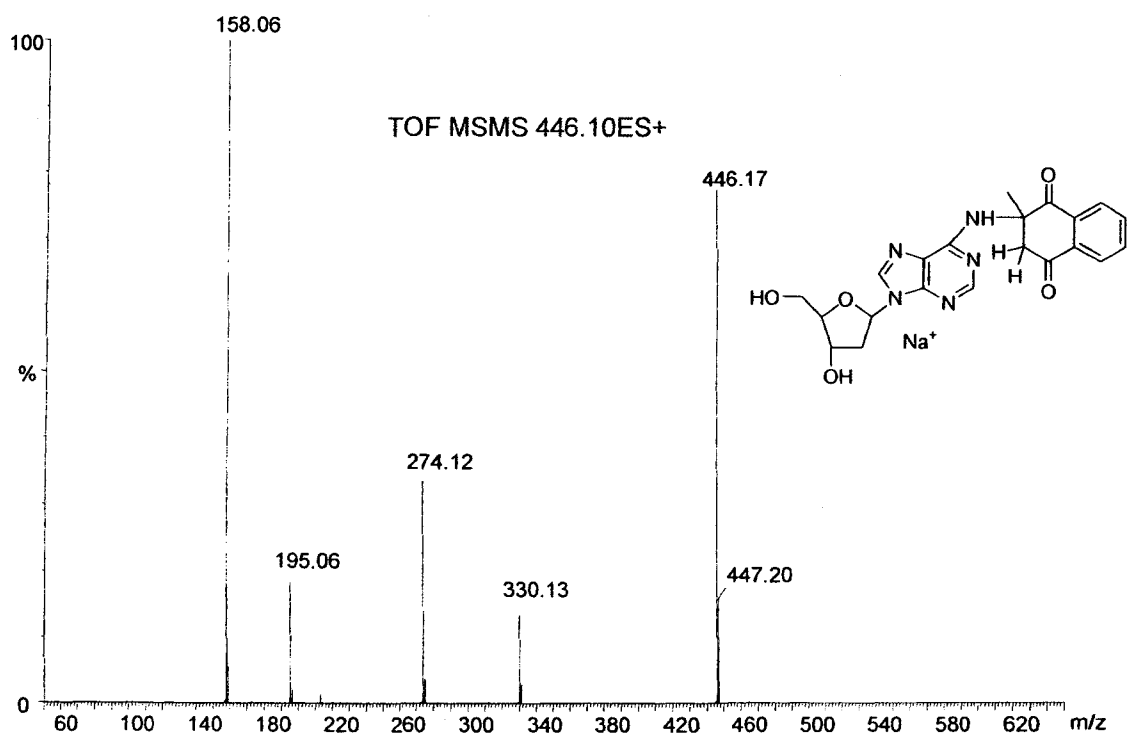
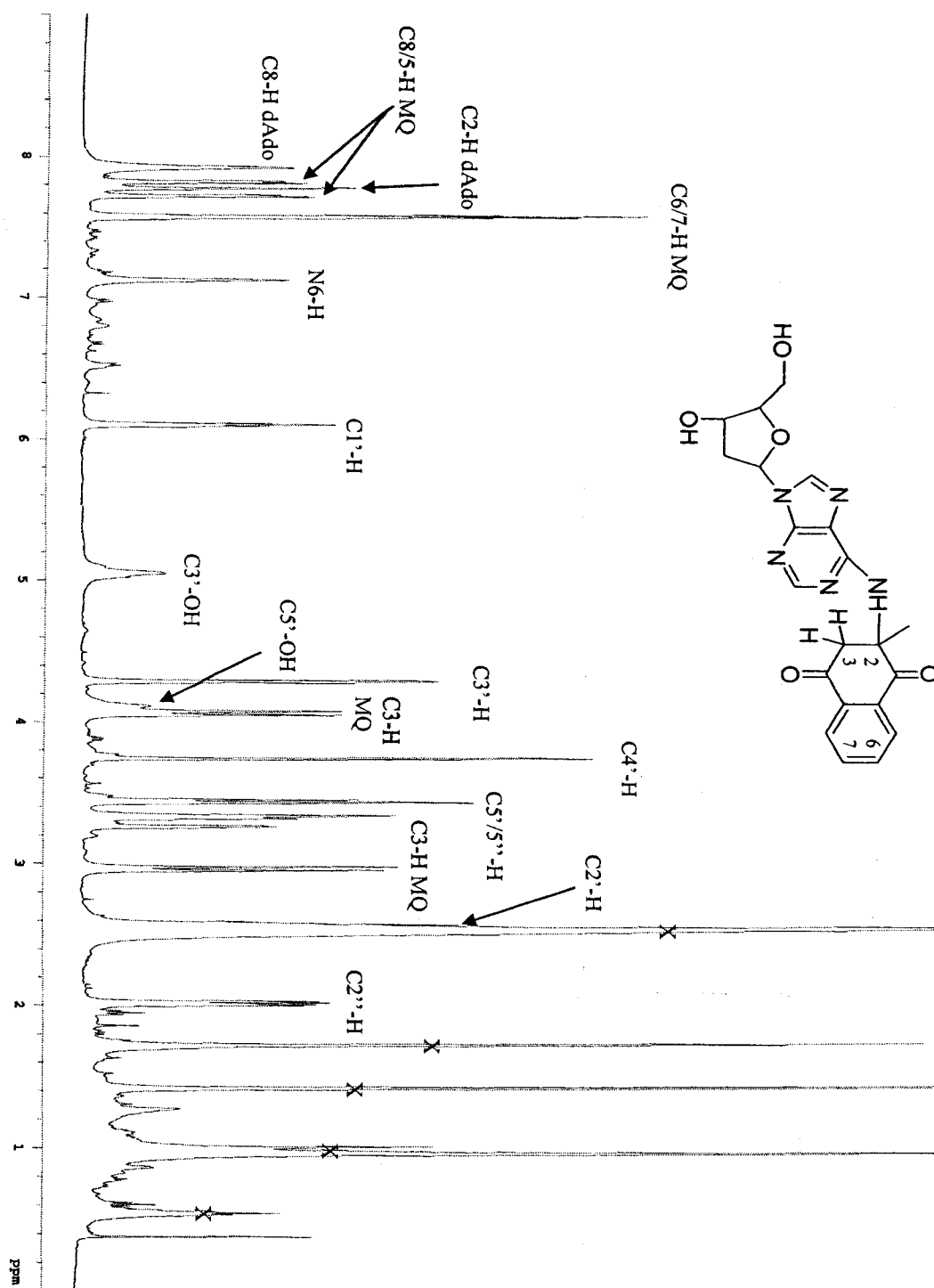
**S8. Figure 8.** Co-elution of products from dry film and from DNA.

Figure 8. Co-elution of products from dry film and from DNA. Upper trace: analysis of the reaction between dAdo and MQ-linker after 60 min of photolysis (red), and co-injection of the latter with products isolated from DNA (black). HPLC analysis using method III. Bottom trace: analysis of the reaction between dAdo and MQ after 60 min of photolysis (red) and control non-irradiated (black). HPLC analysis using method IV.

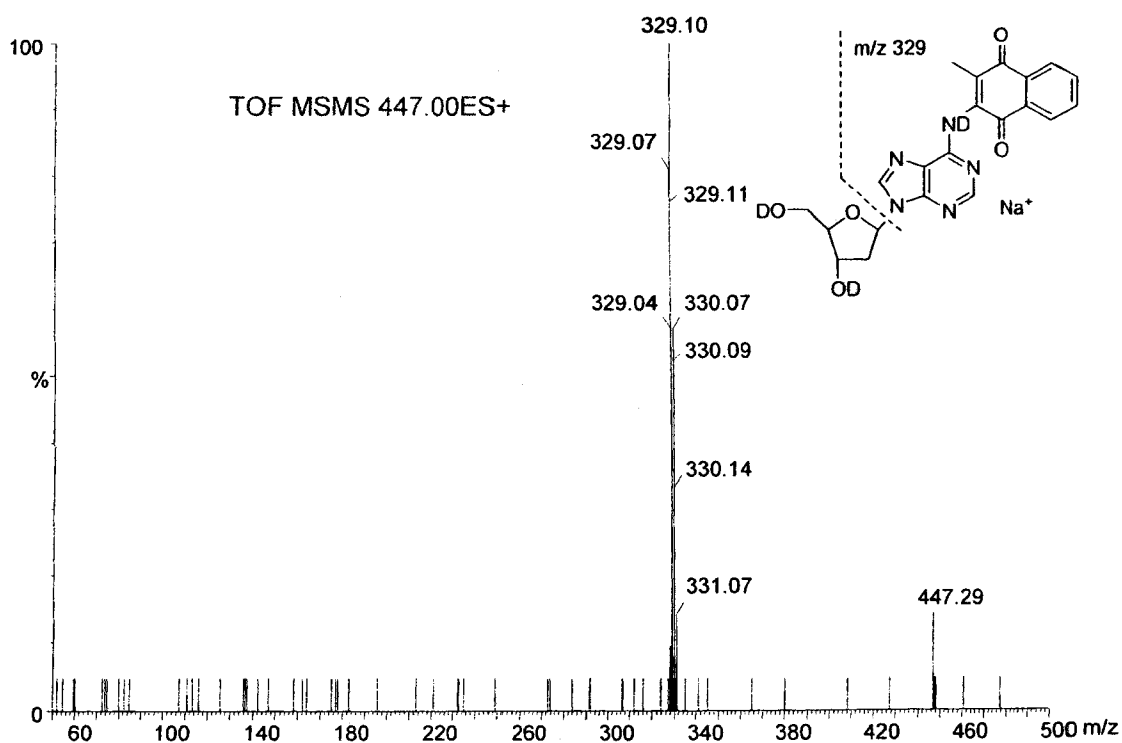
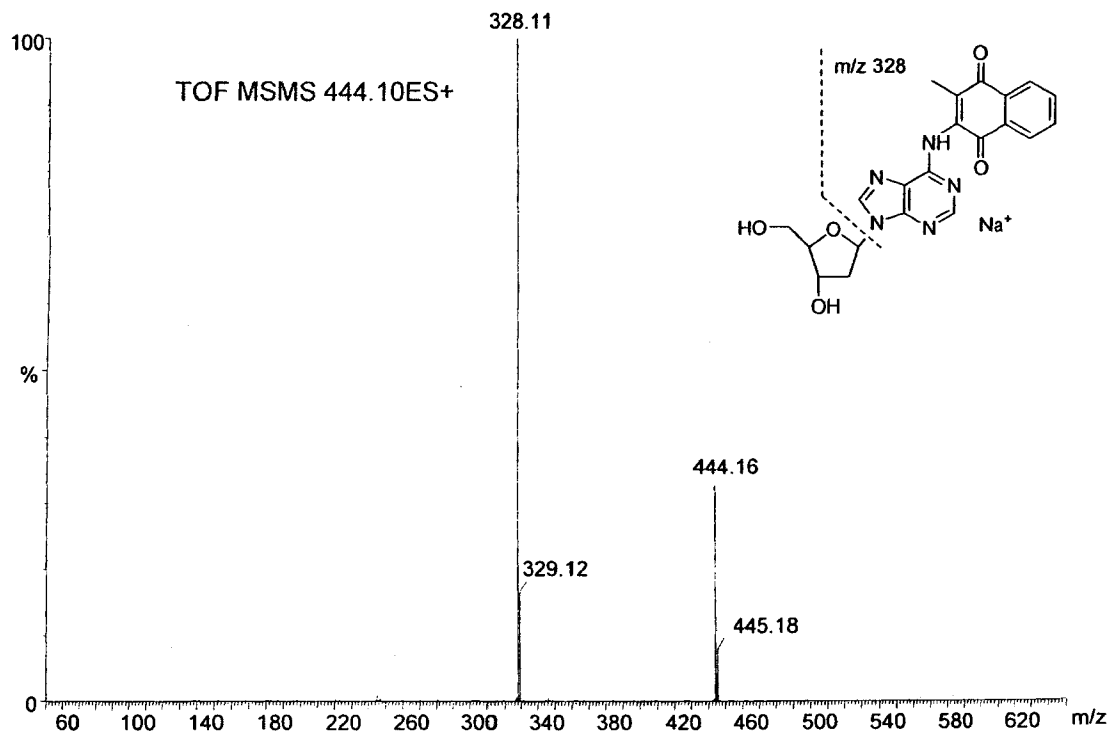
**S9. Figure 9.** ESI-MS/MS of product **2c** in non-deuterated solvent (upper) and deuterated solvent (bottom).



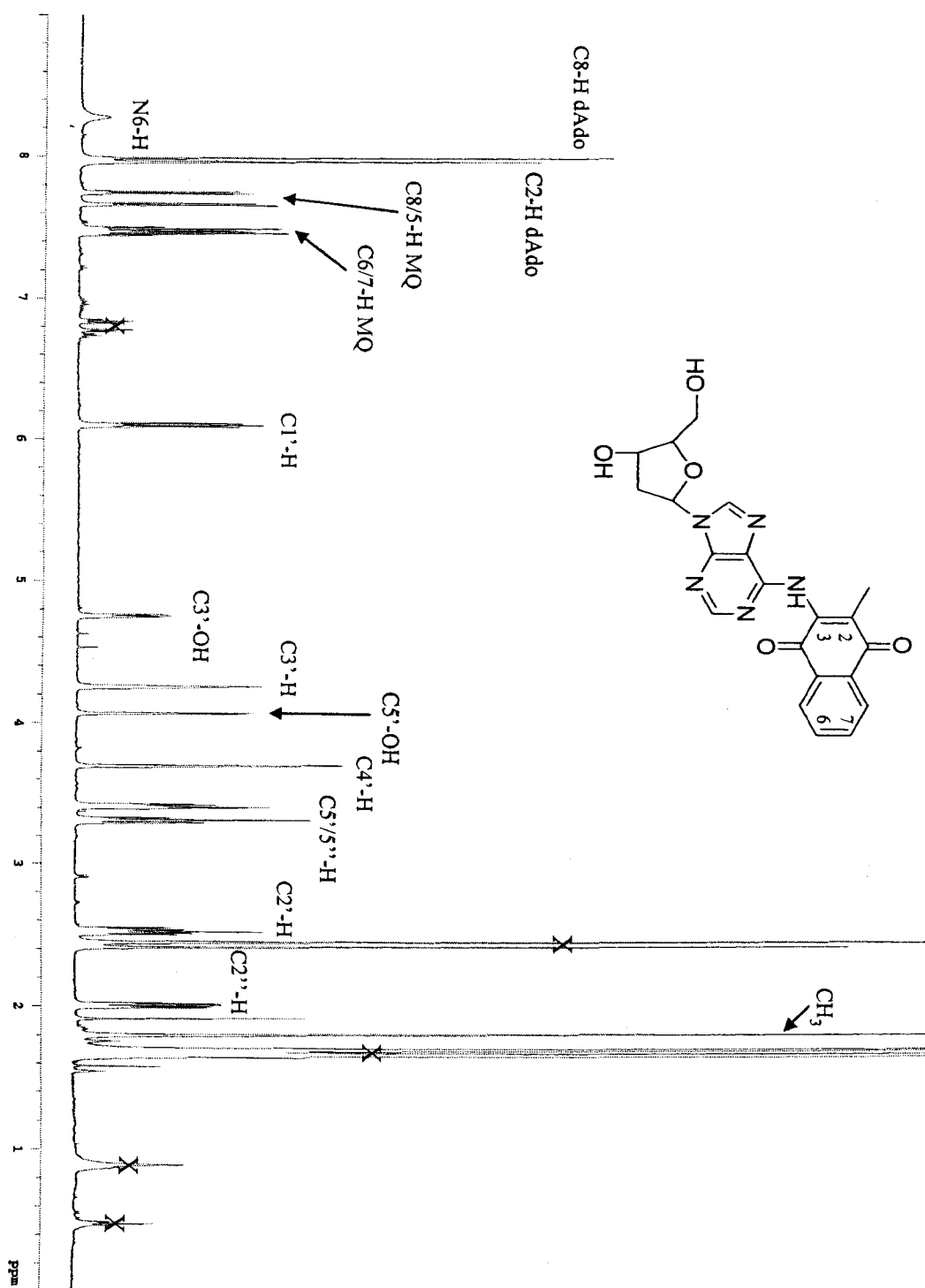
S10. Figure 10.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of product 3c in acetone- $d_6$ .



**S11. Figure 11.** ESI-MS/MS of product **4c** in non-deuterated solvent (upper trace) and deuterated solvent (bottom trace).



S12. Figure 12.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of product **4c** in acetone- $\text{d}_6$ .





## **Chapitre V : Sélection d'expériences non publiées**

### **V-1 Synthèse de la ménadione protégée**

Nos premiers travaux de synthèse ont visé à insérer, par la synthèse automatique d'ADN, MQ liée à l'uridine dans les oligonucléotides. Cependant MQ s'est avérée être trop instable dans les conditions de réaction nécessaires à la liaison à l'uridine, et de plus MQ est instable aussi dans les conditions de déprotection finale des oligonucléotides. Cette instabilité est due à l'attaque très favorable, par addition de Michael, des bases et autres nucléophiles sur le C3 de MQ. Cette réaction peut être bloquée par la protection des cétones de MQ, qui sont d'abord converties en alcools benzyliques de la quinone réduite. Nous avons appliqué le protocole de Snyder et Rapoport (1974) pour synthétiser la 1,4-diméthoxy-2-méthyl-naphthohydroquinone. Cette dernière est résistante aux traitements acides et basiques employés durant la synthèse d'oligonucléotides. La protection est clivée rapidement par oxydation au moyen de sels d'argent  $\text{Ag}_2\text{O}$  dans l'acide nitrique. Par contre, dans le même laps de temps nécessaire à la déprotection de MQ, nous avons constaté que le milieu de déprotection dégrade partiellement les nucléosides, et nous avons abandonné cette stratégie de protection.

### **V-2 Synthèse de l'acide 6-carboxylique de MQ par alkylation de Friedel-Crafts**

L'alkylation du 2-méthyl-naphthalène par le chlorure d'acétyle a été réalisée selon le protocole décrit par Friese et al. (1993), puis les semicarbazones des isomères 8-acétyl et 6-acétyl-2-méthyl-naphthalène ont été synthétisées afin de faciliter leur séparation. Les tentatives de conversion du 6-acétyl-2-méthyl-naphthalène en acide 2-méthyl-6-

carboxynaphthoïque (l'acide 6-carboxylique de MQ) par oxydation par l'hypobromite, selon le protocole décrit dans la même référence ayant été infructueuses, nous nous sommes tournés vers une autre stratégie de synthèse de l'acide 6-carboxylique de MQ qui est celle décrite dans l'article 1 (chapitre II).

### **V-3 Synthèse d'un adduit Adénine-MQ sur le sucre**

Les isomères 2' et 3'-O-(aminopropyl)adénosine ont été synthétisés selon le protocole décrit par Griffey et al. (1996). Ensuite, leur conjugaison avec l'acide 6-carboxylique de MQ en milieu basique en présence de l'agent de couplage pyBOP a fourni, avec de hauts rendements, les adduits 2' et 3' adénine-MQ, séparés par CLHP. La photolyse éclair de ces adduits a été réalisée en collaboration avec l'équipe de D. Houde, afin de détecter un éventuel transfert de charge entre MQ et l'adénine, mais cette étude n'a pas fourni de résultats significatifs.

### **V-4 Purification des oligonucléotides par différents traitements**

L'électrophorèse des oligonucléotides tels qu'ils sont reçus de la compagnie qui les synthétise montre, après traitement à la pipéridine, qu'ils contiennent des oxydations artéfactuelles avant d'être photolysés. Étant donné que les rendements de transfert de charge aux G sont faibles lorsque MQ est insérée au milieu des oligonucléotides (voir la figure 1 de l'article 1), différentes méthodes ont été testées afin d'envisager de faire diminuer ces oxydations. Les oligonucléotides ont été incubés dans la pipéridine, ou en présence des enzymes de réparation Fpg ou endoIII, ou non incubés (contrôle) puis purifiés par CLHP. Les niveaux d'oxydation ont été contrôlés par gels de séquençage. Le

traitement à la pipéridine des oligonucléotides s'est avéré être le moyen le plus efficace pour éliminer les brins oxydés avant la photolyse.

### **V-5 Digestion de l'ADN ponté par différents mélanges d'enzymes**

Pour mesurer correctement la consommation des nucléosides par le transfert de charge induit par MQ dans les oligonucléotides et aussi pour isoler et purifier le pontage il est important que les enzymes de digestion utilisées ne soient pas inhibées par le pontage, et qu'elles puissent digérer l'ADN au plus proche des bases pontées. L'action du mélange d'enzymes PII/SVP/PA (Bellon et al. 2002; Sugiyama et al. 1990) a été comparée à celle du mélange P1/PA. Les enzymes PII, SVP et PA sont des exonucléases. PII clive l'ADN depuis les extrémités 5'OH tandis que SVP clive depuis les extrémités 3'OH. Toutes deux libèrent des nucléotides qui sont ensuite déphosphorylés par PA. L'enzyme P1 est une endonucléase. Dans les deux cas la digestion de l'ADN est incomplète. Cependant le second mélange est capable de digérer l'ADN en laissant une seule base de part et d'autre du pontage A<sup>MQ</sup>, alors que le premier mélange laisse de plus grands fragments d'ADN non digéré. Ce résultat suggère que l'impossibilité d'ouvrir l'ADN proche du pontage nuit au fonctionnement des exonucléases. Par contre, une fois que le pontage a été isolé sous la forme d'un tétramère (trois nucléotides plus MQ), SVP est capable d'enlever les bases adjacentes au pontage MQ<sup>A</sup> (voir article 3).

### **V-6 Comparaison de AQ et MQ**

L'efficacité de AQ et MQ à induire du transfert de charge et des pontages dans des oligonucléotides de même séquence a été comparée en utilisant le duplexe V (voir article 1). Les quinones sont liées à l'ADN de façon identique. Les duplexes ici ont été traités à la pipéridine et purifiés avant d'être utilisés, ce qui n'est pas le cas dans les expériences publiées dans les articles 1, 2 et 3. La concentration de l'ADN est de  $2\mu\text{M}$ . Après photolyse de 180 minutes en milieu oxygéné et sans traitement à la pipéridine la formation du dimère atteint 19% dans les duplexes contenant AQ et 39% dans ceux liés à MQ. Après traitement à la pipéridine la proportion de dimère restant est 6.5 % dans les duplexes liés à AQ, ce qui indique qu'un tiers des dimères formés par AQ résiste au traitement basique à chaud. Dans les mêmes conditions la proportion de dimère impliquant MQ est de 8.5%, ce qui indique que 78% des dimères ont été clivés. Toujours après traitement à la pipéridine, l'oxydation au premier doublet de G est de 33% avec AQ et de 14% avec MQ. Dans ces conditions les oxydations au deuxième site GG sont faibles et non significatives.

Des essais ont été réalisés dans le but de déterminer l'influence, sur les rendements de transfert de charge, de la concentration d'ADN photolysé lié à MQ. Dans la gamme de 0.1 à  $8\mu\text{M}$  il n'a pas été trouvé de concentration optimale.

La photolyse du duplexe contenant AQ a été répétée à une concentration de  $4\mu\text{M}$ , mais sans traitement préalable à la pipéridine. Le clivage mesuré après 60 minutes au premier GG est de 39%, 9.7 % au deuxième GG, 6% au troisième, 5.4% au quatrième et 3.3% au cinquième. À chaque fois le clivage est supérieur sur le 5'G du doublet de G. Les intensités de clivage indiquent une décroissance exponentielle du transfert avec la distance. À titre de comparaison, dans une séquence où les GG sont séparés de trois

bases, l'équipe de G.B.Schuster constate que le clivage sur les doublets de G est constant sur la séquence (voir la discussion).

### **V-7 Effet d'un sel de Lithium sur le transfert et les dimères induits par MQ**

Lors de la photolyse éclair de MQ en présence d'amines dans l'acétonitrile oxygéné, les demi-vies du radical anion de MQ et du radical cation des amines sont augmentées par l'ajout dans le milieu de perchlorate de Lithium  $\text{LiClO}_4$  (Mac et Wirz, 2002). Ce sel de Lithium inerte forme un appariement avec le radical anion de MQ, ce qui aide à la séparation des radicaux et ralentit leur recombinaison. Pour réaliser l'étude, les auteurs ont utilisé une concentration de sel de Li de 40mM avec une absorbance de MQ de 0.3 OD. Nous avons testé si le sel de Li pouvait diminuer la recombinaison des radicaux dans l'ADN contenant MQ lié au centre du duplexe. Ceci devrait favoriser l'injection de cation dans les duplexes et améliorer les rendements de transfert de charge. Dans notre expérience nous avons utilisé une concentration de 50mM de  $\text{LiClO}_4$  et des oligonucléotides ayant une densité optique de MQ beaucoup plus faible que 0.3 OD. Les duplexes d'ADN liés à MQ (1 $\mu\text{M}$ ) ont été photolysés dans le tampon Phosphate de Sodium 10 mM avec ou sans sels de Li. Aucun effet du Li n'a été observé sur le rendement de transfert de charge ou sur la formation de dimère. Par contre dans les contrôles le sel de Li induit une légère dégradation de l'ADN simple brin.

### **V-8 Effet de la substitution d'une ou plusieurs adénines par une inosine en face de MQ dans les duplexes où MQ est liée au centre**

Lorsque dans le duplexe I (**Chart 1** article 1) la base Y est I (molécule **38 Figure 8**), le taux de formation de dimère est le même que lorsque la base est A. Après digestion enzymatique de l'ADN contenant le dimère, les seuls pontages détectés sont des dimères MQ<sup>A</sup> et non pas MQ<sup>I</sup>. Ceci peut avoir deux origines : le pontage MQ<sup>A</sup> est formé plus favorablement qu'un pontage MQ<sup>I</sup>, qui a peut-être un rendement nul ou très faible. Ou encore le pontage MQ<sup>I</sup> est perdu pendant l'étape de digestion enzymatique. Sur la même séquence nous avons ensuite substitué par I non seulement l'adénine en face de MQ mais aussi les deux adénines latérales. La proportion d'ADN ponté passe de 50% à 30% dans ces conditions. La sensibilité du dimère au traitement à la pipéridine est comparable à celle du dimère obtenue avec A en face de MQ. Par CLHP nous n'avons isolé aucun produit ponté après digestion de l'ADN contenant le dimère, lorsque 3 I remplacent 3 A (voir discussion).

### **V-9 Photolyse de duplexes liés à MQ et contenant 5-OHdUrd**

Deux duplexes contenant une 5-OHdUrd (**18 Figure 5**) et liés à MQ en bout de chaîne (duplexes similaires au duplexe V **chart 1** article I) ont été photolysés. Le premier duplexe contient 5-OHdUrd en position 6 sur le brin complémentaire au brin portant MQ, et le second duplexe contient 5-OHdUrd en position 11. Dans les séquences, les 5-OHdUrd remplacent à chaque fois une Thd, ce qui ne devrait pas perturber l'appariement des brins, et sont situées immédiatement en 5' d'un doublet de G. Le potentiel

d'oxydation de 5-OHdUrd est voisin de celui de la 8-oxodGuo, qui est un piège efficace au transfert de charge (Burrows et Muller. 1998; Wagner et al. 1992). La photolyse de ces duplexes est comparée à celle du duplexe de contrôle V non substitué dans la même expérience. Un clivage franc de 6% est remarqué sur gel avant photolyse à la hauteur des 5-OHdUrd. Ce clivage est de 40% après traitement à la pipéridine, révélant qu'une suroxydation de 5-OHdUrd a déjà eu lieu avant la photolyse. La photolyse n'induit pas d'augmentation significative du clivage dans les oligonucléotides contenant 5-OHdUrd. Le niveau trop élevé d'oxydation des oligonucléotides empêche de voir un effet du transfert de charge.

### **V-10 Effet de l'espaceur reliant MQ à l'ADN**

MQ a été lié à l'ADN au moyen d'un espaceur qui est une Thd modifiée. Celle-ci est alkylée sur le méthyle par une chaîne linéaire constituée d'une partie acrylamide liée à un résidu aminoéthyle (nom du produit : C2-DT, numéro 10-1037-XX chez Glen Research). Le groupe terminal de l'espaceur est une amine primaire sur laquelle est conjuguée MQ, dans les mêmes conditions de conjugaison décrites dans l'article 1. Contrairement à l'espaceur que nous avons utilisé dans les autres expériences de transfert de charge avec MQ et AQ, il n'y a pas de site abasique dans la zone de liaison de la quinone à l'ADN. Par contre il est tout à fait possible que l'espaceur porté par la Thd ait un appariement anormal avec l'adénine qui lui fait face. La photolyse du duplexe contenant C2-DT lié à MQ est effectuée en parallèle à la photolyse du duplexe I (article 1). Sans traitement à la pipéridine, la part de duplexe I dimérisé est 44% après 120 minutes. Dans le même temps elle est de 11% dans le duplexe contenant C2-DT. Après



traitement à la pipéridine les quantités de dimères sont divisées par 4 dans les deux cas. Le clivage des doublets de G est comparable dans les deux types de duplexe. Par contre aucun clivage n'est décelé en face de MQ dans le duplexe C2-DT alors qu'il y a 5% de clivage au niveau des trois bases (TAT) directement en face de MQ.

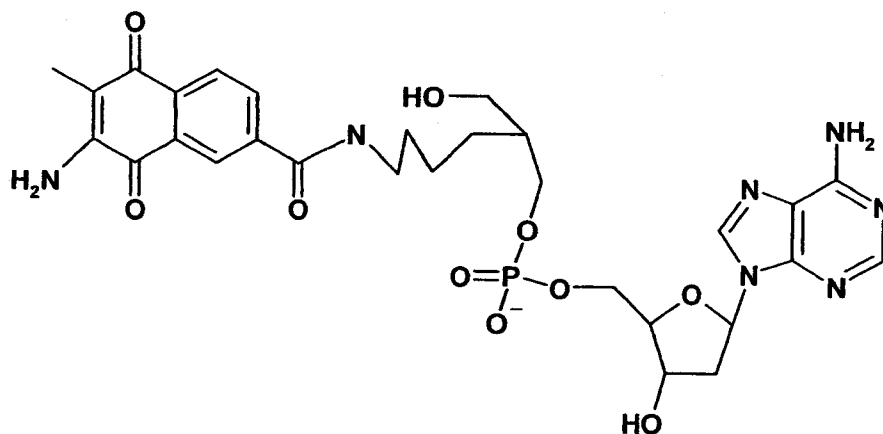
### **V-11 Photolyse d'un duplexe d'ADN contenant deux MQ**

Une séquence d'ADN analogue à la séquence V (chart 1 article 1) a été synthétisée en incorporant, sur le brin portant MQ, un second espaceur à la place du T le plus proche du premier espaceur. Après conjugaison le duplexe contient deux MQ séparées par une A. La photolyse du duplexe contenant deux MQ est comparée, dans la même expérience, à celle du duplexe contenant une seule MQ (séquence V). Un taux légèrement plus élevé de dimère est obtenu avec deux MQ dans le duplexe (35% contre 30%). Les vitesses initiales de formation sont très semblables dans les deux cas. Par contre le clivage aux GG est inhibé lorsque le duplexe contient deux MQ.

### **V-12 Formation d'un adduit aminé de MQ-A lors de la photolyse**

La digestion enzymatique de solutions photolysées du duplexe I lié à MQ (chart 1 article 1) fournit les produits 2a, 3a et 4a tels qu'indiqués dans la figure 2 de l'article 3. Lorsque la solution d'ADN est photolysée plus longtemps un quatrième produit est élué par CLHP après digestion. La quantité de ce produit 5a augmente alors que celle de 4a diminue. La photolyse de 2a, 3a et 4a isolés n'a pas conduit à la formation de 5a, ni l'incubation de 2a, 3a et 4a dans des milieux de différents pH. Le produit 5a semble se

former seulement dans l'ADN. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de 5a est très similaire au spectre RMN du produit 1 décrit dans l'article 3, avec comme différence majeure l'absence du signal pour le proton en C3. Les données de RMN et de spectrométrie de masse en conditions deutérées et non-deutérées sont en faveur de la structure proposée en **Figure 21** pour le produit 5a. Si 5a provient de la désamination de A ou de C on s'attend à détecter la formation de 2'-désoxyinosine **38** ou de 2'-désoxyuridine **26** (**Figures 8 et 6**). La formation de ces produits n'a pas été détectée en quantités suffisantes pour expliquer la formation de 5a, dont l'origine est inconnue.



**Figure 21 : structure de 5a**

## **Chapitre VI : Discussion**

## **VI-1 Liaison des quinones à l'ADN**

La liaison, par un lien covalent, du photosensibilisateur (PS) à l'ADN est devenue un standard pour l'étude du transfert de charge. Cette contrainte permet de connaître le site initiateur du transfert, et certains auteurs considèrent que les résultats d'études de distance de transfert de charge dans lesquels l'oxydant est sous forme libre sont source de confusion (Giese. 2004; Nakatani et Saito. 2004).

MQ a été liée aux oligonucléotides après la synthèse des brins, par la formation d'un lien amide sur un espaceur commercial (Glen Research) incorporé dans les oligonucléotides pendant leur synthèse. Cette modification post-synthétique des oligonucléotides nous a permis de lier MQ avec des hauts rendements. La stratégie que nous avons initialement prévue pour lier MQ au milieu des brins d'ADN est celle employée par l'équipe de G.B. Schuster (Ly et al. 1999), qui consiste à lier la quinone au sucre de l'uridine pour ensuite insérer ce nucléoside modifié pendant la synthèse des oligonucléotides. Cette stratégie s'est avérée inopérante avec MQ en raison de la trop grande dégradation de la quinone pendant les diverses étapes de synthèse. De plus l'instabilité de la quinone dans les conditions de déprotection des oligonucléotides laissait présager qu'une grande proportion de la quinone insérée serait détruite dans les oligonucléotides. Nous avons envisagé de protéger la ménadione pendant les étapes de liaison à l'ADN (voir chapitre V) et de la déprotéger à la toute fin de la synthèse mais les conditions nécessaires à la déprotection de MQ ont provoqué la dégradation des nucléosides lors des tests que nous avons effectués.

### VI-1.2 Liaison au centre des duplexes d'ADN

Lorsqu'il est inséré dans les oligonucléotides en position centrale, l'espaceur lié à MQ ou AQ comporte trois carbones séparant les groupements phosphates des nucléotides qu'il relie, ce qui correspond au même espacement que crée un sucre 2-desoxyribose normal. L'absence d'une base d'ADN au niveau du site de liaison des quinones empêche par contre qu'il y ait un appariement de la base en face de l'espaceur. Les mesures de dichroïsme circulaire indiquent que l'ADN lié à MQ adopte une forme B normale. Le point de fusion du duplexe lié à MQ et contenant A en face de MQ est trois degrés plus bas que le point de fusion du duplexe contenant l'espaceur non conjugué, ce qui montre que MQ perturbe la structure du duplexe. À l'inverse, AQ liée sur l'uridine participe à la stabilisation du duplexe (Ly et al. 1999; Schuster. 2000), tel qu'indiqué par le point de fusion deux degrés plus haut pour l'ADN lié à AQ que pour celui non lié. L'affinité pour l'ADN de thymus de veau, de différentes AQ substituées et non liées à l'ADN, a été mesurée par des expériences de spectroscopie de fluorescence et d'absorption UV (Armitage et al. 1994). La similarité des valeurs de constantes d'association des différents isomères de AQ indique que le squelette de la quinone est responsable de l'affinité pour l'ADN, et donc que les substituants linéaires jouent un rôle mineur dans l'association avec le polymère. Les constantes d'association AQ/ADN varient de 7 à 9 x 10<sup>-4</sup> M<sup>-1</sup> pour l'ADN hétérogène. Pour toutes les AQ testées l'association est 3 à 4 fois plus forte avec un ADN polyA/T qu'avec un ADN polyG/C. Les données montrent aussi que toutes les AQ suivent un seul mode d'intercalation. Tandis qu'AQ est intercalée dans l'ADN en 3' de l'uridine qui la lie, nous ne connaissons pas l'orientation de MQ dans nos oligonucléotides. Il est possible que la base en face de MQ soit partiellement en dehors

du duplexe d'ADN, comme cela est remarqué pour les bases qui ne sont pas en face de leur base complémentaire (Holmlin et al. 1997).

### **VI-1.3 Liaison en bout de chaîne d'ADN**

Pour étudier le transfert de charge unidirectionnel de 5' vers 3', MQ et AQ ont été liées à l'extrémité 5' de la séquence V (chart 1 article 1), grâce au même espaceur précédemment décrit. Dans l'ADN construit par Schuster et al, la fonction amide qui lie AQ est espacée du dernier groupement phosphate en 5' par 2 ou 5 carbones (**Figure 12**). Dans ce cas le nombre total de liaisons qui séparent AQ de la base la plus proche est 12 et 15 respectivement. Il est proposé que l'anthraquinone ne peut s'intercaler dans le duplexe car l'espaceur est trop court, et l'hydrophobicité de AQ autant que son caractère déficient en électron comparé aux bases d'ADN vont faire qu'elle chapeaute l'extrémité du duplexe d'ADN (Gasper et Schuster. 1997; Schuster. 2000). Dans notre ADN modifié en 5' avec AQ ou MQ, les quinones sont séparées de la base la plus proche par 16 liaisons, ce qui laisse penser, par une approximation simplement basée sur les similitudes de distance de liaison, que les quinones au bout de nos oligonucléotides peuvent adopter la même configuration que AQ dans les duplexes construits par l'équipe de Schuster.

## **VI-2 Pontages interbrins dans l'ADN lié aux quinones**

### **VI-2.1 Pontages dans l'ADN lié à MQ**

La photolyse des duplexes d'ADN liés à MQ en milieu de séquence ou au bout 5' conduit à la formation très efficace de pontages entre A et MQ. Quand la quinone est liée au centre de l'ADN, l'adénine pontée est celle qui est directement en face de MQ. Le

changement de base en face de MQ a été systématiquement étudié afin de déterminer l'effet de cette base sur le transfert de charge et sur la dimérisation des duplexes. Lorsque la base en face de MQ est I, le pontage MQ<sup>A</sup> se fait avec une adénine voisine située en oblique. Nous ne savons pas s'il s'agit de l'adénine du côté 5' ou 3' par rapport au centre du duplexe, ou bien des deux. Il est possible aussi qu'un pontage MQ<sup>I</sup> se forme lorsque I est en face de MQ cependant ce pontage n'a pas été isolé. Dans les duplexes ayant T, C ou G en face de MQ (duplexes II, III, IV chart 1 article 1) l'analyse par gel indique que du dimère se forme aussi, mais comme le pontage peut se faire avec les bases tant en face que latéralement cette analyse par gel est insuffisante pour connaître la nature de la base impliquée dans le pontage. La purification des pontages par CHLP n'a pas été effectuée avec C, G et T en face de MQ si bien que la nature des pontages décelés dans les duplexes en question est inconnue. Lorsque les trois A qui sont à proximité de MQ sur le brin complémentaire sont remplacés par trois I un pontage interbrin est décelé par électrophorèse. Aucun pontage n'est détecté après digestion enzymatique et analyse par CLHP des duplexes photolysés, ce qui prouve que le pontage décelé sur gel ne provient pas des adduits MQ<sup>A</sup> car ceux-ci sont tous suffisamment stables pour être isolés. Il peut paraître étonnant que le pontage soit résistant pour moitié au traitement à la pipéridine et soit ensuite perdu lors de la digestion enzymatique cependant nous avons remarqué que la dégradation des pontages réversibles MQ<sup>A</sup> est lente dans le duplexe d'ADN et qu'elle s'accélère lorsque l'ADN est digéré. Sachant que MQ est capable d'oxyder T il est raisonnable d'envisager que la ménadione peut aussi effectuer un pontage avec T. Le potentiel d'oxydation de I est 0.3V en dessous de celui de T (O'Neill et Barton. 2004b) et donc de la même façon le potentiel d'oxydation n'est pas un obstacle à la formation des

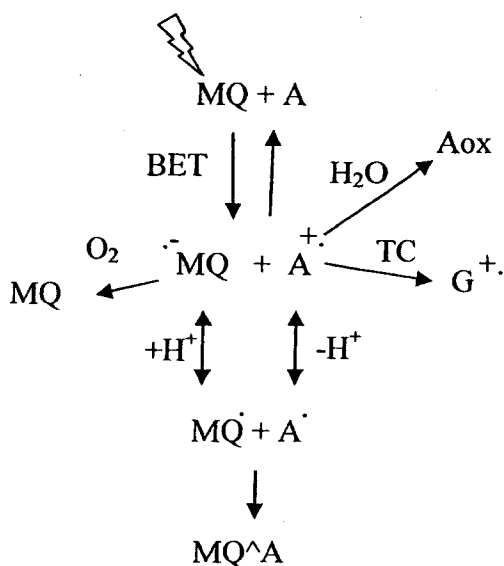
pontages MQ<sup>I</sup>. Le pontage qui se forme dans l'ADN contenant trois I en face de MQ et qui est perdu après digestion peut être soit un pontage MQ<sup>T</sup> réversible (clivable), soit un pontage MQ<sup>I</sup> réversible. Les pontages MQ<sup>A</sup> qui sont réversibles (produits 2 et 3 de l'article 3) contiennent la forme réduite de la quinone, et la réversibilité est obtenue par le retour à la forme oxydée de la quinone. Des structures similaires pour les pontages réversibles de MQ<sup>T</sup> et MQ<sup>I</sup> sont imaginables. Cependant il est difficile d'expliquer pourquoi une forme oxydée stable de ces pontages n'a pas été trouvée.

## VI-2.2 Affinité de MQ pour A et de AQ pour T

### VI-2.2.1 Affinité au centre des duplexes d'ADN

L'élucidation des structures des pontages entre A et MQ permet d'affirmer que leur mécanisme de formation dans les duplexes étudiés n'implique pas la voie du méthide de quinone. Nous avons plutôt proposé que la ménadione photoexcitée arrache d'abord un électron à l'adénine, ce qui crée le radical anion de MQ et le radical cation de A, puis que le radical de MQ se protonne tandis que celui de A se déprotonne pour fournir les radicaux neutres dont la recombinaison crée la liaison covalente des pontages MQ<sup>A</sup> (**Scheme 3** de l'article 3). Outre le fait qu'un tel mécanisme fournit des produits structurellement différents de ceux qui seraient obtenus par la voie du méthide de quinone, le mécanisme que nous avons décrit implique que la molécule MQ et l'adénine qui lui fait face sont très peu séparées physiquement pour que 1) MQ arrache un électron sur la même adénine dans 50 à 60% des duplexes, 2) les radicaux se protonnent/déprotonnent avant que le radical cation d'adénine ne se déplace sur une base voisine, et avant que l'oxygène ne réagisse avec l'anion radical de MQ. La protonation de





**Figure 22: compétition des réactions lors de la formation de pontages MQ<sup>•</sup>A dans l'ADN**

MQ est lente à pH = 7.0. Le pKa du couple radical neutre/radical anion de MQ est 4.6 (Fisher et Land. 1983). À l'inverse le pKa du couple radical neutre de A/radical cation est inférieur ou égal à 1 (Steenken. 1989), ce qui témoigne de l'acidité du radical cation de A. Dans l'eau les réactions de protonation/déprotonation sont des réactions unimoléculaires. Dans notre ADN, il peut y avoir un échange direct de proton entre MQ et A, par une réaction bimoléculaire. Une synthèse des différentes réactions en compétitions avec la formation de pontage MQ<sup>•</sup>A est présentée à la **Figure 22**.

À l'inverse de nos observations, il est rapporté que la présence d'un à 3 A à proximité du PS favorise la séparation de charge positive (trou) de celle négative du PS dans les oligonucléotides liés à un PS naphthalddiimide (Kawai et al. 2003a; Kawai et al. 2003b). De même, l'injection de radical dans l'ADN par AQ est très efficace quand la quinone est proche de A ou de T (Sanii et Schuster. 2000). La vitesse de réaction de O<sub>2</sub> avec le radical

anion du PS est un facteur déterminant pour l'efficacité de transfert de charge, puisqu'une réoxydation rapide du PS empêche le transfert inverse d'électron (ou back electron transfer BET) et influence directement l'efficacité de transfert de charge (Kawai et al. 2005). Dans notre ADN lié à MQ l'oxydation du radical anion de MQ par  $O_2$  n'est pas efficace. Plus encore, le taux de formation des pontages MQ<sup>+</sup>A n'est pas influencé par la présence ou non d' $O_2$  (voir paragraphe suivant). Ceci suggère un empilement de MQ sur A ou bien même un appariement partiel dans lequel MQ joue le rôle de la base d'ADN qui manque en face de A. Cependant il faut garder à l'esprit que MQ déstabilise le duplexe auquel elle est lié par conséquent la relation qui existe entre MQ et A n'est pas stabilisante pour le reste du duplexe.

Il est néanmoins concevable que le pontage MQ<sup>+</sup>A stable (produit 4) découle aussi de l'attaque du radical neutre de A sur MQ native. Mais ceci n'est possible que si MQ a d'abord oxydé A puis a été régénérée par  $O_2$  tandis que la radical cation de A était déprotonné. Un tel mécanisme a été mis en évidence lors l'alkylation de MQ par le radical neutre de A, quand ces molécules sont sous forme libre en solution aérée (Wang et Liu. 2002). Ce mécanisme suppose que la formation des produits par cette voie est empêchée lorsqu'il n'y a pas d'oxygène dans le milieu. Or comme nous avons constaté que la formation des produits 2 et 3 est indépendante de la présence d'oxygène et que la formation du produit 4 est peu dépendante de  $O_2$  nous avons écarté ce mécanisme pour la formation des pontages dans les duplexes liés à MQ.

Il existe dans les duplexes une affinité de MQ pour A qui n'est pas seulement due au fait que MQ est en face de A, puisque dans les duplexes de même séquence où AQ est liée en face de A le pontage s'effectue avec T. L'affinité que MQ a pour A peut expliquer

pourquoi nous n'avons pas décelé de pontage MQ<sup>T</sup> alors qu'un tel pontage se produit entre AQ et T dans le même ADN. De la même façon nos résultats suggèrent pour AQ une affinité avec T au lieu de A. Étant donné que le potentiel d'oxydation de T est supérieur à celui de A, l'affinité AQ-T semble être structurale puisqu'elle est inversement corrélée au potentiel d'oxydation de la base. On pourrait aussi envisager que le BET entre AQ et A est si efficace que les radicaux de AQ et A s'annihilent, ce qui a pour conséquence de ne jamais former le dimère AQ<sup>A</sup>. Cependant tel que mentionné plus haut le voisinage de plusieurs T ou plusieurs A proches de AQ a été recommandé pour avoir une bonne séparation des charges (Sanii et Schuster. 2000). C'est la proximité de G ou C qui fait augmenter le BET. En ce qui concerne la possibilité que le BET nuise à la formation de dimère MQ<sup>T</sup>, les données spectroscopiques (Wagner et al. 1990b) indiquent que l'état triplet de MQ induit les produits d'oxydation de Thd avec des rendements de 100%. Au contraire, il est attendu qu'un BET plus efficace se produise entre MQ et A. Par conséquent il est peu probable que le BET soit le paramètre responsable de l'absence de pontages MQ<sup>T</sup>.

### *VI-2.2.2 Affinité en bout de chaîne d'ADN*

Dans le duplexe où MQ est liée en bout de chaîne, en 5' (séquence V), les pontages ont été visualisés par électrophorèse, puis, par CLHP après digestion des duplexes, le pontage MQ<sup>A</sup> a été isolé, le même que trouvé dans l'ADN contenant MQ lié en son centre. Nous n'avons pas montré quelle adénine du brin complémentaire à celui portant MQ est impliquée dans le pontage, cependant il est raisonnable de penser qu'il s'agit de l'adénine la plus proche de l'extrémité 3', car la plus proche suivante est située 5 bases plus loin. Contrairement à ce qui a été observé lorsque MQ est liée en position

centrale dans l'ADN, l'adénine pontée n'est pas opposée à MQ, et c'est T qui est en face dans la séquence. Ce résultat ne milite pas en faveur de l'empilement de MQ à l'extrémité de la chaîne, contrairement à ce qui a été proposé pour AQ dans l'ADN construit par Schuster, puisque MQ entre en contact et réagit avec A, qui est plus éloignée que T. Dans ce cas aussi la réactivité qu'ont A et MQ suggère une affinité structurale entre ces deux molécules. Lorsque AQ est liée au bout de nos duplexes d'ADN le pontage formé par photolyse est un pontage AQ<sup>T</sup> identique à celui formé avec AQ liée au centre des duplexes. Comme T est la base qui est au bout du duplexe, il est possible dans notre ADN comme dans celui de Schuster, que AQ soit empilée sur les bases du bout du brin complémentaire, et que le T du pontage AQ<sup>T</sup> soit la dernière base du duplexe. Cependant nous n'avons pas précisé, lorsque le pontage se fait au bout, quel T est lié à AQ. Il pourrait s'agir du deuxième T en partant de l'extrémité 3' du brin complémentaire, qui est la base voisine du A qui se lie vraisemblablement à MQ dans les pontages MQ<sup>A</sup>. Ainsi, nous ne démontrons pas que AQ est empilée en bout de chaîne dans nos duplexes, et AQ peut aussi bien être intercalée, tout comme MQ semble l'être. À notre connaissance, le seul PS dont le lieu d'intercalation est parfaitement connu est l'intercalant de Rh utilisé par Barton et al. Ce PS induit du TC à longue distance quand il est illuminé à 365 nm. À 313 nm, par contre, il provoque une cassure de brin qui indique où il est intercalé (O'Neill et Barton. 2004b).

### **VI-2.3 AQ ne fait pas de pontages dans tous les duplexes (pourquoi l'équipe de G.B. Schuster n'observe pas de produits de pontage?)**

La formation de dimère dans nos duplexes contenant AQ est 4 à 6 fois moins importante que dans les duplexes liés à MQ, et en particulier lorsque AQ est en bout de

brin la part de duplexes pontés ne dépasse pas 10%. Tout paramètre qui va faire baisser ce pourcentage va rendre plus difficile la détection des pontages sur gel d'électrophorèse, où les bandes représentant quelques pourcents de la radioactivité totale sont souvent noyées dans le bruit de fond.

#### ***VI-2.3.1 la formation de pontage dépend de la liaison du PS à l'ADN***

L'emploi du nucléoside modifié C2-DT pour relier MQ au centre des duplexes d'ADN fait chuter l'efficacité de formation de pontage. Cet effet peut être attribué à la disparition du site abasique qui était formé par l'autre espaceur. Cependant la formation du dimère n'est pas annulée complètement par l'usage de C2-DT, ce qui prouve que le site abasique n'est pas un pré-requis absolu pour former des pontages. Ceci est une différence majeure avec le mécanisme de formation des dimères dans les duplexes décrits par Cecchini et al, pour lesquelles le mésappariement de l'ADN est indispensable (Cecchini et al. 2005b). La molécule qui lie la quinone dans l'ADN décrit par Schuster est structuralement plus proche de C2-DT que de l'espaceur qui crée le site abasique, et par conséquent la formation de dimère est défavorable dans les duplexes étudiés par Schuster et al.

#### ***VI-2.3.2 compétition pontage/TC***

Dans les duplexes d'ADN étudiés par l'équipe de Schuster, le transfert de charge est généralement plus efficace que dans les nôtres, comme il en sera discuté plus bas. Le pontage consomme une molécule de quinone. Dans le cas des pontages MQ<sup>A</sup> la quinone est pour un tiers dans une forme oxydée qui pourrait lui permettre d'être encore

photoactive (produit 4), et pour deux tiers dans une forme réduite inactive à la lumière. L'impact du piégeage de AQ dans le dimère est inconnu : dans les pontages AQ<sup>T</sup> la quinone a été identifiée sous forme oxydée mais sa photoactivité n'a pas été testée. Nous avons montré que la formation de pontage origine de l'oxydation d'une base par le photosensibilisateur pour donner un radical cation, et nous savons d'autre part que la formation du radical cation des bases est à l'origine du transfert de charge dans l'ADN. Le dimère consomme un radical cation qui ne fera pas de transfert de charge, et donc, sans même prendre en compte le piégeage des quinones dans le pontage, la formation de pontage est en compétition avec le transfert de charge. Dans l'ADN construit par Schuster, la liaison de AQ différente de la nôtre fait que le transfert de charge est favorisé si bien que les radicaux cations des bases sont rapidement éloignés de AQ et ne se pontent pas avec le PS.

### **VI-3 Transfert de charge dans l'ADN**

#### **VI-3.1 Disparité des résultats selon les systèmes étudiés**

La coexistence des différentes théories de transfert de charge dans l'ADN est expliquée par l'utilisation, par les équipes qui étudient ce phénomène, de systèmes chimiques difficilement comparables les uns aux autres (Giese. 2004; Nakatani et Saito. 2004; Schuster et Landman. 2004). Principalement, chaque équipe utilise un ou plusieurs oxydants différent de ceux des autres équipes. Ces oxydants varient par leur potentiel de réduction et leur liaison à l'ADN. Leur mode d'interaction avec le duplexe n'est pas toujours connu (intercalation complète, partielle ou nulle). Ensuite, les séquences sur

lesquelles ces oxydants sont liés varient d'un laboratoire à l'autre. Certains laboratoires utilisent comme trappe de trou d'électron les triplets de G (Giese. 2002), tandis que d'autres considèrent que cette séquence n'est pas plus un piège que les doublets de G (Lewis et al. 2003) et lui préfèrent des bases modifiées telles que la 8-oxodGuo. Enfin, les résultats de transfert de charge ne sont pas exprimés de la même façon, et les rendements d'oxydation aux G ne sont pas toujours rapportés.

Les différentes théories de transfert de charge ne tendent pas vers un consensus, car les PS utilisés pour l'établissement de ces théories fournissent des résultats non seulement différents mais parfois opposés lors d'expériences de transfert de charge. En guise de rappel, une séquence de 4 A défavorise grandement le transfert de charge induit par AQ entre deux GG (Santhosh et Schuster. 2002), tandis que cette même séquence augmente le transfert à longue distance quand Rh(III) est lié à l'ADN (Williams et al. 2000). Un effet polarisant de l'ADN pourrait expliquer ce phénomène, mais cet effet n'a pas d'influence sur le transfert induit par AQ (Santhosh et Schuster. 2002). Le transfert de charge induit par l'équipe de Barton est grandement atténué si l'empilement  $\pi$  est perturbé. À l'inverse divers mésappariements de base n'ont pas d'effet sur le transfert de charge dans les duplexes liés à AQ (Boone et Schuster. 2002; Schlientz et Schuster. 2003). L'incapacité à trouver un mécanisme fédérateur par les deux équipes les plus impliquées dans l'élucidation des mécanismes de transfert de charge, a mené l'équipe de Schuster à publier des articles mettant en doute la validité des résultats de l'autre équipe (Santhosh et Schuster. 2002; Turro et Barton. 1998). La polémique a été alimentée par une étude rapportant que le type de transfert de charge propre aux métalintercalants de Rh (III) provient d'un artefact (Fahlman et al. 2002) : dans certaines conditions de

photolyse, les duplexes liés au Rh(III) s'agglomèrent, si bien que le PS d'un duplexe peut être en contact avec un autre duplexe auquel il n'est pas lié par un lien covalent. Ainsi l'oxydation aux G induite par la photolyse peut ne pas provenir du TC à longue distance au travers de l'ADN, mais être la conséquence d'un transfert de charge à distance beaucoup moindre que prévue. Suite à cette découverte, Barton et al ont vérifié qu'aucun d'agrégat n'était formé dans leurs propres conditions d'étude du TC, et ont rejeté le caractère artéfactuel des résultats de TC induit par le Rh(III) (voir plus loin).

### **VI-3.2 Disparité de nos résultats dans nos systèmes étudiés**

#### ***VI-3.2.1 MQ liée au centre des duplexes d'ADN***

La dépendance du transfert de charge sur la distance est mesurée facilement par analyse sur gel de polyacrylamide dénaturant par électrophorèse de l'ADN photolysé, après traitement à la pipéridine (voir annexe I et article 1). Le ratio : taux de clivage du doublet de G le plus éloigné du photosensibilisateur dans la séquence, divisé par le taux de clivage du doublet de G le plus proche du PS est le ratio clivage distal/proximal, noté D/P.

Selon les différentes expériences que nous avons effectuées avec MQ liée au milieu du duplexe I (voir article 1 chart 1) le ratio D/P varie entre 0.3 et 0.8, pour des doublets de G séparés par trois bases : TAT. Puisqu'il est inférieur à 1, ce ratio indique que le transfert diminue avec la distance. Le ratio est très comparable à celui mesuré par l'équipe de G.B. Schuster lorsque les G ou GG sont séparés de une à trois bases, et est considéré comme étant peu dépendant de la distance. Ce résultat peut laisser à penser que du transfert à très longue distance pourrait être observé dans ce duplexe lié à MQ si la séquence GGTAT



était répétée plus que deux fois de part et d'autres de la quinone, cependant le taux de clivage aux sites GG distaux devient vite proche du bruit de fond provenant du clivage non spécifique de toutes les bases du duplexe. Ceci illustre la nécessité d'avoir non seulement un transfert de charge à longue distance mais aussi que ce transfert se produise en rendements suffisants pour être caractérisé sans ambiguïté (Williams et al. 2004). À titre de comparaison le rendement quantique de la formation de dimère est 60 fois plus élevé que celui de l'oxydation aux G dans la séquence I (**chart 1** article 1).

### *VI-3.2.2 MQ liée à l'extrémité des duplexes d'ADN*

Dans la séquence V liée à MQ le ratio de clivage GG2/GG1 est 0.1, et la même valeur est trouvée pour le ratio GG3/GG2, ce qui signifie que le transfert de charge décroît rapidement avec la distance. Le logarithme du taux de clivage diminue linéairement à chaque base parcourue. Cette décroissance exponentielle n'est pas attribuable ici à un effet de moyenne de la séquence car la séquence étudiée est une répétition de TATGG. La dépendance forte sur la distance est comparable à ce qu'ont mesuré Barton et Lewis dans les expériences d'annihilation de fluorescence entre un oxydant intercalé et une G séparés de quelques bases (O'Neill et Barton. 2004b; Shafirovich et Geacintov. 2004). Le mécanisme de transfert de charge proposé dans ce cas est le mécanisme de superéchange, qui implique un transfert d'électron entre le donneur et l'accepteur sans qu'il y ait ionisation de l'ADN qui les sépare (Lewis et Wasielewski. 2004).

### **VI-3.3 Transfert de charge dans l'ADN lié à AQ**

#### ***VI-3.3.1 Comparaison entre les résultats de Schuster et al. et les nôtres***

##### **VI-3.3.1.1 AQ liée au centre des duplexes d'ADN**

Dans notre séquence I liée à AQ, le ratio D/P est de 0.4-0.5 de part et d'autre de la quinone centrale, ce qui est très proche des valeurs trouvées de 0.3-0.8 quand MQ est liée dans les mêmes conditions, cela est aussi comparable aux valeurs de transfert de charge mesurées par l'équipe de Schuster quand 3 bases séparent les doublets de G même si dans notre cas la dépendance sur la distance est plus marquée.

##### **VI-3.3.1.1 AQ liée à l'extrémité des duplexes d'ADN**

Quand AQ est lié en 5' du brin dans le duplexe V le ratio D/P est de 0.2 pour GG2/GG1 ce qui traduit une baisse drastique du taux de clivage entre les deux premiers sites GG. La valeur du rapport D/P remonte ensuite à 0.6-0.8 pour les ratios GG3/GG2, GG4/GG3 et GG5/GG4. Lorsque AQ est le PS plutôt que MQ le taux de clivage est plus élevé à tous les GG ce qui permet des mesures significatives jusqu'au site GG5 séparé de AQ par 24 bases (80 Å). Ainsi, le profile de clivage est comparable, quoique plus efficace, à ce qui a été obtenu avec MQ pour la même séquence. Par contre, ce profile de clivage est différent de ce qui a été observé par Schuster et al quand AQ est liée à l'extrémité du duplexe dans une séquence où les G sont séparés par 1 à 3 bases (Liu et al. 2004). Dans ce cas le clivage est également distribué sur toute la séquence, ce qui revient à mesurer un ratio D/P de 1.

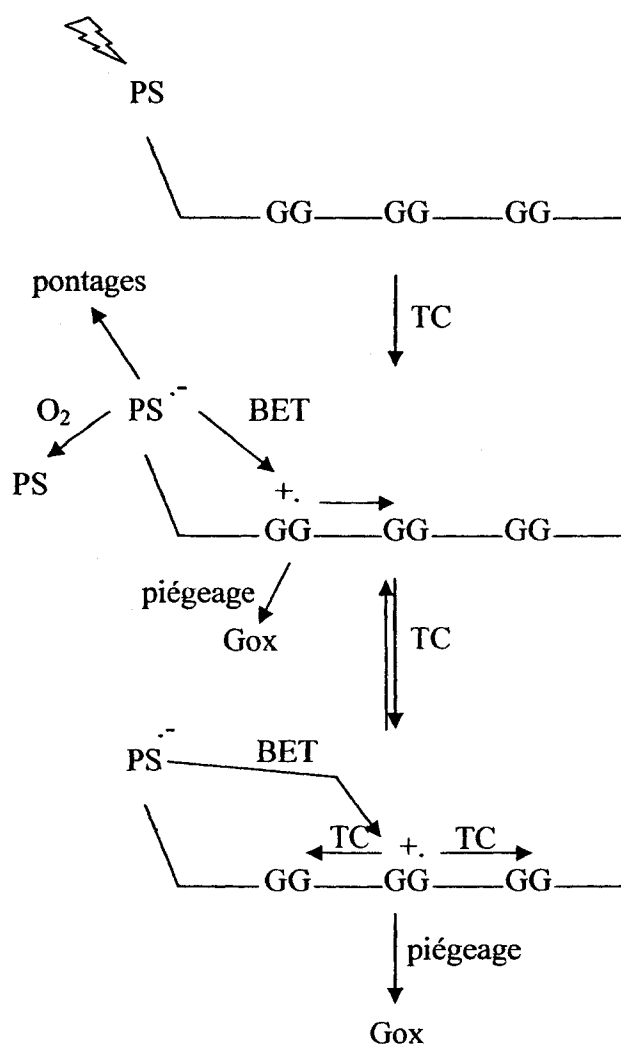
### **VI-3.4 Mécanisme de transfert de charge dans nos oligonucléotides modifiés**

Le mécanisme de transport de charge par saut du polaron peut être proposé dans nos duplexes d'ADN contenant les quinones liées au centre, puisque les valeurs de clivage mesurées après photolyse de ces duplexes sont en accord avec les valeurs rapportées par Schuster et al pour des séquences similaires.

Ce mécanisme, valide quand les quinones sont liées au centre de nos duplexes d'ADN, ne décrit plus le transfert de charge qui s'opère lorsque les quinones sont liées en 5'. La grande dépendance sur la distance notée dans ce cas par AQ et MQ est en contradiction avec ce qui a été observé pour AQ dans les duplexes de l'équipe de Schuster. Encore une fois ce mécanisme s'apparente à du superéchange.

### **VI-3.5 Facteurs (autres que la distance et la séquence) modulant le transfert de charge dans l'ADN**

L'imbrication des différentes voies chimiques dans le processus de TC est montrée dans la **Figure 23**. Le mécanisme représenté ici implique l'ionisation du pont d'ADN séparant le PS des GG. Dans un premier temps, le PS dans un état triplet excité arrache un électron à une base proximale. L'efficacité de cette première étape dépend des potentiels d'oxydoréduction du PS et de la base à laquelle il arrache un électron. Elle dépend aussi du rendement quantique de formation de l'état triplet des PS, puisque cet état va favoriser la séparation des charges. Sans tenir compte de la formation des pontages, la compétition entre le BET et la régénération du PS par O<sub>2</sub> influence la suite du TC. La concentration d'oxygène et le potentiel d'oxydation du PS sont les paramètres qui gouvernent cette régénération.



**Figure 23: réactions en compétition durant le transfert de charge dans l'ADN induit par un PS.**

La base oxydée proche du PS (généralement A ou T) peut soit être piégée en un produit d'oxydation soit régénérée par l'oxydation d'une base voisine, généralement un G. La cinétique de TC dépend, à cette étape, de l'équilibre entre ces deux réactions. Mais à tout moment le trou peut être annulé par le BET si le PS n'a pas été régénéré.

La migration du trou d'électron de G à G nécessite que le radical cation de G oxyde un G natif. Selon la théorie de TC par saut du polaron, cette étape est régulée par les mouvements de l'ADN. Par saut au travers de domaines d'ADN alignées, par contre, les G sont oxydés lorsqu'ils sont alignés avec le PS, ou bien alignés avec une base qui peut leur arracher un électron.

Le trou sur G peut encore migrer ou être annulé par BET ou finalement être piégé après déprotonation ou hydratation du radical cation. La compétition entre le piégeage et le BET est doublement dépendante de la concentration d'O<sub>2</sub>, car de dernier intervient dans la formation de l'oxazolone **30** et de 8-oxodGuo **32**.

### *VI-3.5.1 BET et couplage du PS avec le premier GG*

Sans être liée à l'ADN, MQ a une vitesse de régénération par O<sub>2</sub> mesurée à 0.1 μsecondes (Fisher et Land. 1983). Dans l'ADN, la durée de la migration du trou d'électron de A vers G séparés de 2 bases est quand à elle estimée à 0.4 μsecondes (Giese. 2004). À première vue ces valeurs laissent supposer que lorsque le trou s'est localisé sur le G la régénération de MQ a eu lieu. Dans notre ADN, comme il en été fait mention plus haut, la régénération d'un grand nombre de MQ par l'oxygène est inefficace, ce qui permet la réaction de formation des pontages. La perte d'efficacité de régénération de MQ par O<sub>2</sub> augmente aussi la part du BET dans notre système.

Un BET qui se produit à très courte distance entre le photooxydant et le trou d'électron a lieu même si le trou s'est éloigné du photooxydant par transfert de charge dans l'ADN. Particulièrement quand la base oxydée est G, le temps de réaction de G avec l'eau est lent. Les constantes de vitesses d'hydratation et de déprotonation du radical cation de G

sont de l'ordre de  $10^6$  et  $6 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$  respectivement (Giese. 2004; Kawai et Majima. 2004). Si le radical anion du PS n'est pas consommé par l'oxygène, le retour de l'électron sur G peut être plus rapide ( $10^9 \text{ s}^{-1}$ ) que le piégeage du cation en produit stable (Dohno et al. 2003; Kawai et al. 2005). Ce phénomène se traduit par une annulation ou une baisse des rendements de clivage, dont la proportion n'est pas mesurable sur un gel d'électrophorèse. Dans l'ADN, les études de spectroscopie résolue dans le temps permettent d'observer le BET généré par les photooxydants (Kawai et Majima. 2004; Lewis et Wasielewski. 2004; O'Neill et Barton. 2004b; Shafirovich et Geacintov. 2004).

La thionine est un photooxydant au potentiel de réduction similaire à celui du complexe de Rh (2V), et voisin de celui de AQ (2.2V). Dans les duplexes d'ADN auxquels la thionine est liée, celle-ci s'intercale et arrache un électron à G après illumination (Dohno et al. 2003). Ensuite, l'électron suit le chemin inverse et revient intégralement sur G. L'analyse par gel ne montre aucun clivage dans l'ADN lié à la thionine. La preuve que la thionine est capable d'oxyder transitoirement G a été obtenue en substituant G par  $^{CP}G$  : l'analyse par CLHP des duplexes photolysés a montré la formation des produits d'ouverture de la fonction cyclopropyle de  $^{CP}G$  (Williams et al. 2004). Cette étude a mis en lumière le rôle du BET dans le transfert de charge dans l'ADN, qui expliquerait la disparité de résultats des différents systèmes d'étude. Une étude semblable a permis de rapporter que la vitesses de BET s'effectue en 6 picosecondes entre un PS naphthalidiimide alors que le transfert de charge vers les G pour ce même PS nécessite 300 microsecondes (Kawai et al. 2005).

Ces études témoignent du fait que le transfert de charge est un phénomène qui s'étale sur plusieurs échelles de temps, et que les résultats du transfert de charge observés par l'utilisation de gels d'électrophorèse ne révèlent qu'une partie du phénomène.

Les propriétés de clivage de AQ et celles du Rh(III) dans une même séquence d'ADN comportant deux sites GG séparés de C(A)<sub>6</sub>C sont différentes, puisque le premier photooxydant montre un ratio de 0.07, indiquant que le GG distant est 15 fois moins clivé que le premier, alors que le second montre un ratio D/P de 1.4, traduisant une oxydation plus marquée au site distant. Ces résultats, obtenus dernièrement dans un même laboratoire (Williams et al. 2004), corroborent les résultats précédemment établis par deux équipes distinctes, et comportent en plus des expériences de contrôle qui écartent la possibilité que les résultats de transfert de charge mesurés avec les métalintercalants soient dus à des artefacts. Dans la même étude sont aussi comparées les propriétés des intercalants Ru(II) et Éthidium. Rh(III) est décrit comme étant un PS qui injecte efficacement un trou d'électron à distance, et le ratio D/P positif pour Rh(III) est expliqué par le fait que cet oxydant connaît un BET efficace avec le premier site GG. À l'inverse, le BET d'AQ n'est pas prépondérant avec le premier site GG. Le rendement quantique d'oxydation des deux GG est de valeur  $0.2 \times 10^{-4}$  dans le cas de AQ. C'est un rendement 10 fois plus élevé qu'avec Rh(III). Étant donné que l'oxydation est 15 fois plus importante au GG proche, ce rendement rend compte surtout de l'oxydation à ce premier GG. Ceci semble indiquer un couplage entre AQ et le GG proche, qui favorise l'oxydation mais pas le BET. À l'inverse, il est peut proposé que Rh(III) est couplé avec l'ADN sur toute sa longueur, mais que le BET est défavorisé par rapport au TC lorsque la charge s'éloigne du PS. Quand la charge est suffisamment éloignée de Rh(III) elle peut se

stabiliser sur le GG distal. La notion de couplage à longue distance est empruntée à la théorie de transfert par saut au travers des domaines d'ADN alignés. Dans ce sens, l'effet du BET dans le transfert de charge à longue distance dans l'ADN appuie cette théorie.

### *VI-3.5.2 Potentiel de réduction du PS*

L'effet du potentiel de réduction de cinq photooxydants a été comparé dans plusieurs duplexes d'ADN courts (7 bases) constitués de A en face de T. La substitution d'un A central par une base de plus faible potentiel d'oxydation permet de moduler le potentiel d'oxydation du duplexe au complet. Ainsi, en combinant les cinq PS avec les différents duplexes d'ADN, 16 combinaisons de différences de potentiel entre l'oxydant et le pont d'ADN ont été étudiées par spectroscopie d'absorption transitoire (Lewis et al. 2000). L'étude a montré que l'augmentation de la différence de potentiel est bénéfique sur le taux de transfert de charge, jusqu'à ce que cette tendance s'inverse (région inversée de Marcus). Cette étude confirme dans l'ADN ce qui est connu pour des réactions bimoléculaires. Cet effet pourrait contribuer aux différences d'efficacité de transfert de charge observées pour les différents PS. Premièrement leur potentiel d'oxydation est différent, et ensuite ils n'arrachent pas tous l'électron sur la même base, puisque Rh(III) est intercalé dans le duplexes tandis que AQ est empilée au bout, ce qui modifie la différence de potentiel d'oxydoréduction PS-ADN du système.

Ces derniers points montrent la complexité de connaître parfaitement tous les paramètres caractérisant le système chimique dans lequel le transfert de charge est induit.



Ceci est illustré par l'évidence que AQ dans notre système adopte une efficacité de transfert de charge différente de celle mesurée dans les duplexes construits par Schuster et al.

### **VI-4 Oxydation de l'ADN par transfert de charge**

La consommation des quatre nucléosides par le transfert de charge, décrite dans l'article 1 (table 2) est, à notre connaissance, la première qui a été rapportée dans la littérature concernant un duplexe d'ADN lié de façon covalente à un PS. Cependant ces valeurs nécessitent d'être révisées à la lumière des résultats d'identification du dimère MQ<sup>A</sup> (article 3). En effet la mesure des nucléosides perdus comprend la perte de 2 A et une T qui restent reliés à MQ dans le dimère tétramérique après la digestion de l'ADN par les enzymes P1 et PA. Les valeurs corrigées de la perte des nucléosides par le TC induit par MQ sont les suivantes, en pourcentage de la perte totale des nucléosides: G 35%, A 10%, C 31% et T 23%.

La photolyse de G en solution en présence de MQ est inefficace (Douki et Cadet. 1999). Ceci est expliqué par le piégeage lent du radical de G en produit final d'oxydation, ce qui permet au BET de se produire entre les deux espèces radicalaires de G et MQ. L'oxydation efficace de G est observée par contre lorsque les quatre nucléosides sont photolysés en présence de MQ en concentration équimolaire en solution aérée (Douki et Cadet. 1999). Dans ce cas la dégradation de G compte pour 80% de la dégradation totale des nucléosides, suivie de T (11%), C (5%) et A (4%). La perte de G indique qu'elle est oxydée par les radicaux cations des autres nucléosides, qui se régénèrent par un transfert de charge avec G en solution. Le radical cation de G est le plus formé parce que son

potentiel d'oxydation le plus bas des quatre nucléosides l'empêche de se régénérer en arrachant un électron sur les autres.

Dans l'ADN de thymus de veau, la dégradation des nucléosides par photolyse en présence de MQ non liée a été mesurée par Douki et Cadet (1999), en dosant la formation des produits d'oxydation des nucléosides. L'étude révèle que G est aussi la base la plus oxydée, car 86% des nucléosides dégradés proviennent de G (8-oxo-dGuo 32 > oxazolone 30 > FapydGuo 31). La 8-oxodAdo 36 est produite à hauteur de  $\approx 5\%$ , et est le seul produit de dégradation de A détecté. Les produits d'oxydation de T (5-ForUra > 5-HMUra) représentent aussi environ 5 %, tandis que 5-OHCyt et 5-OHUra provenant de C en quantités voisines comptent pour 3%. La formation des glycols de Thd 14 ainsi que du FapydAdo 37 n'a pas été mesurée dans cette étude, du fait de l'absence de standards appropriés pour ces molécules. Il y a une grande similarité dans la distribution des dommages des quatre nucléosides sous forme libre et dans l'ADN photolysés par MQ. Ceci indique que l'oxydation des nucléosides dans le polymère double brin non lié à MQ et l'oxydation des nucléosides libres suivent les paramètres cinétiques semblables de transfert de charge.

L'illumination de l'ADN à 266 nm au moyen d'un laser biphotonique provoque l'ionisation des quatre bases de façon égale (Douki et al. 2004; Douki et al. 2001). Encore une fois, le transfert de charge qui en découle provoque la dégradation dominante de G en comparaison des autres bases. La dégradation de G est indiquée par la formation de 8-oxodGuo. Les glycols de Thd sont les deuxièmes produits d'oxydation formés en terme de rendement, et comptent pour 60% du taux de 8-oxodGuo formée. 8-oxodAdo, 5-FordUrd et 5-HMdUrd sont détectés à hauteur de 10% relativement à 8-oxodGuo.

Dans notre ADN lié à MQ au centre du duplexe l'oxydation aux G est, par contre, moins prépondérante et on observe une plus grande répartition des dommages. Une telle répartition implique que les radicaux cations des bases ne convergent pas vers les G autant que la théorie de transfert de charge dans l'ADN le prévoit. Paradoxalement un tel résultat n'est pas attendu dans une séquence comme le duplexe I, où l'on a montré par gel que le transfert de charge sur les GG distaux se fait efficacement, avec un patron d'oxydation des doublets de G qui s'accorde avec la théorie de transfert de charge par saut du polaron.

### VI-4.1 Dommages à T

Récemment l'équipe de Schuster a montré que l'oxydation sur T est possible dans un duplexe d'ADN lié à AQ et qui ne contient pas de G (Joy et al. 2006). AQ, qui a un potentiel de réduction suffisant pour oxyder les quatre bases, oxyde un T ou un A dans son voisinage, puis le radical cation migre et se stabilise sur un T distant. La formation du radical cation de T observée par Schuster est confirmée par la formation du pontage entre AQ<sup>+</sup>T que nous avons décrit (article 2). Il est proposé que le radical « visite » les séquences A/T puis finit par se stabiliser sur une zone favorable (principalement les T centraux des TTT). L'insertion d'un doublet de G dans la séquence fait disparaître totalement le dommage aux T, en piégeant le radical cation dans ce site de bas potentiel d'oxydation. Il est vérifié que les adénines ne sont pas oxydées, et que l'absence de dommage aux A ne provient pas de la lenteur de la pipéridine à convertir en coupure l'éventuel dommage à A. Le dommage aux T, qui est alkali-labile, serait 5-FordUrd. Cette étude suggère que l'oxydation de T par transfert de charge est défavorable dans un

ADN comportant des G, contrairement à ce qui a été montré dans les études de Douki et al (Douki et Cadet. 1999; Douki et al. 2001) et la nôtre.

### VI-4.2 Dommages à A et C par transfert de charge

Une autre étude de transfert de charge dans l'ADN induit par l'effet direct du rayonnement laser (193 nm) montre la formation préférentielle de dommages aux G avec l'indication que A peut être oxydée (Melvin et al. 1998). La localisation des dommages est obtenue par clivage des bases oxydées par la pipéridine, ainsi que par les enzymes de réparation Fpg et endo III. Cette dernière reconnaît certaines modifications des pyrimidines et induit une coupure de brin à leur niveau. Aucun dommage aux pyrimidines n'est rapporté dans cette étude, où les dommages sont visualisés par gel d'électrophorèse.

La participation des A lors du TC est mise en évidence notamment par les travaux de Kawai et Giese (Giese. 2004; Kawai et al. 2005). Giese a démontré que A est le deuxième transporteur de charge après G, et que le transfert de charge par saut dans l'ADN se fait efficacement à longue distance au travers des séquences poly-A. Kawai a mesuré que le transfert de charge dans une séquence poly-A s'opère à un taux supérieur à  $10^8$  par seconde sur une distance de 30 Å. La formation transitoire des radicaux de C et A lors du transfert de charge, a été prouvée par l'utilisation de  $^{13}\text{C}$  et  $^{13}\text{A}$  respectivement (Nakatani et Saito. 2004; Shao et al. 2005), mais la formation des produits d'oxydation des bases autres que G n'est pas rapportée dans les études de transfert de charge où le PS est lié à l'ADN contenant des G. Néanmoins beaucoup d'études consistent généralement en la mesure des distances de TC par gel d'électrophorèse après traitement de l'ADN

photolysé à la pipéridine, or cette technique ne révèle pas toutes les bases modifiées (Burrows et Muller. 1998).

### **VI-4.3 Particularités liées à l'étude du TC par électrophorèse**

Il a été présenté plus haut que les résultats de transfert de charge observés par gel ne rendent pas compte des événements transitoires du transfert de charge. Une autre critique est ajoutée à l'utilisation combinée des gels et du traitement à la pipéridine de l'ADN photolysé.

#### ***VI-4.3.1 Toutes les lésions de l'ADN ne sont pas alkali-labiles***

La participation des quatre bases dans la formation des dommages oxydatifs générés par TC, telle que l'avons mesurée dans la séquence I liée à MQ, est montrée par les études dans lesquelles les dommages sont détectés par des techniques de spectrométrie couplée à la CHLP (Douki et Cadet. 1999; Douki et al. 2001). Le rendement quantique d'oxydation des G que nous mesurons par gel est beaucoup plus faible que celui que nous mesurons par CLHP-UV ( $0.2$  contre  $12.4 \times 10^{-4}$ ). L'analyse par CLHP-UV couplée à la détection électrochimique des dommages nous indique que 75% des dommages générés sur les G sont des 8-oxodGuo 32, une lésion qui est clivée lentement par la pipéridine (Burrows et Muller. 1998). De façon évidente, une grande partie des dommages oxydatifs de G n'est pas convertie en coupure sur le gel. En généralisant ce constat aux autres types de dommages, on peut suggérer que les dommages aux quatre bases ne sont pas non plus convertis intégralement en coupures par le traitement alkali-labile, et qu'ainsi une grande partie de l'information sur les

oxydations aux autres bases que G n'est pas prise en compte par les études qui se restreignent à l'emploi des gels.

### *VI-4.3.2 La structure de l'ADN influe sur la lésion induite*

Deux études d'ionisation de l'ADN par effet direct de la radiation laser haute intensité (266 nm) ont établi que l'oxydation des G par transfert de charge génère deux types de lésions de G qui ne sont pas clivées par la pipéridine de façon égale (Spassky et Angelov. 1997; Spassky et Angelov. 2002). Principalement, dans les régions très stables de l'ADN que sont les doublets et les triplets de G, le produit d'oxydation des G est clivé jusqu'à 4 fois plus efficacement par l'enzyme de réparation Fpg que par la pipéridine. Étant établi que parmi les lésions de G, Fpg coupe seulement la 8-oxodGuo, alors que la pipéridine clive de façon égale l'oxazolone et la 8-oxodGuo, il est proposé que le clivage généré dans les zones stables de l'ADN origine majoritairement de la 8-oxodGuo **32**. Dans les zones d'ADN instables ainsi que dans les zones d'ADN simple brin l'oxazolone **30** est formée dans une proportion équivalente à celle de **32**. Le ratio de clivage par Fpg/pipéridine à chaque site de G sur l'ADN est un indicateur de la stabilité de l'ADN. **30** et **32** proviennent du même radical **28**, qui se déprotonne pour mener à **30** alors qu'il s'hydrate pour conduire à **32** (**figure 6**). La déprotonation de **28** en solution est prépondérante sur l'hydratation, si bien que la formation de **30** est favorisée par rapport à celle de **32**. Dans l'ADN le ratio de clivage par Fpg/pipéridine rend compte de l'équilibre entre l'hydratation du radical de G, favorisée dans les zones stables, et la déprotonation favorisée dans les zones déstabilisées.

Dans le duplexe V lié à MQ il est vraisemblable que MQ s'intercale puisqu'elle peut se ponter à A qui est interne au duplexe. Cet A est séparé du premier doublet de G par

seulement une base. Si MQ dérange le duplexe par intercalation telle que AQ peut le faire (Ly et al. 1999), il est vraisemblable que le premier site GG, qui est normalement une zone d'ADN stable, soit déstabilisé par la proximité de MQ intercalé. Ainsi il est raisonnable de proposer que le ratio de clivage D/P de 0.1, trouvé par clivage avec la pipéridine pour la séquence V liée à MQ, est sous-estimé par la formation préférentielle d'oxazolone dans le premier GG comparée au second GG. De cette façon la forte dépendance sur la distance mesurée est surestimée. Le même raisonnement peut être appliqué à la séquence V liée à AQ et qui montre aussi une dépendance sur la distance qui est en contradiction avec les capacités de TC mesurées pour AQ par les autres équipes de recherche (Fahlman et al. 2002; Schuster. 2000; Williams et al. 2004).

### Conclusion et perspectives

La ménadione induit du transfert de charge à longue distance dans l'ADN. L'investigation du TC dans de multiples séquences liées à MQ était initialement prévue, mais la formation dominante de dimères entre la quinone et dAdo nous a partiellement détourné de nos objectifs initiaux, ce qui a cependant ouvert d'autres pistes à explorer. De même, la comparaison des propriétés de transfert de charge avec AQ nous a amené à constater que cette molécule référence du transfert de charge dans l'ADN génère aussi des pontages dans notre système, ce que personne n'avait rapporté précédemment. À l'inverse, les propriétés de transfert de charge que nous observons avec AQ sont moindres que ce qui est mesuré par d'autres équipes.

Les pontages dans l'ADN font partie des lésions les plus complexes à réparer. Leur impact est au moins double, puisque de telles lésions sont cancérigènes mais leur toxicité peut aussi être dirigée comme une arme contre les cellules cancéreuses. En ce qui nous concerne, la formation de dimère entre les bases d'ADN et les quinones MQ et AQ puis l'élucidation de leurs structures, nous ont permis d'établir qu'ils proviennent de la formation d'un radical cation d'ADN. En ce sens, ils fournissent un instantané de l'étape initiale du transfert de charge, c'est-à-dire la formation des cations radicaux dans l'ADN. Dans la littérature, il est montré que les radicaux formés au voisinage des photosensibilisateurs s'éloignent de leur point d'origine ou se recombinent par transfert inverse de l'électron (BET). Les raisons du piégeage des radicaux de dAdo et Thd par MQ et AQ ne sont pas élucidées, et surtout, elles ne sont pas prévues par les autres équipes. Ceci montre la difficulté de connaître tous les paramètres définissant un système modèle pourtant initialement prévu pour être une simplification de la réalité. Les



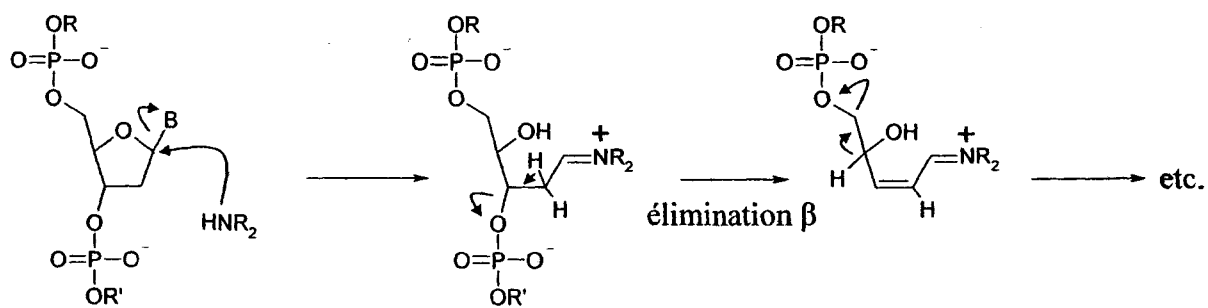
systèmes modèles d'étude du transfert de charge sont régis par de nombreux paramètres intrinsèques aux photosensibilisateurs et à l'ADN. Nos études contribuent à mettre l'accent sur la nécessité de connaître et de maîtriser ces paramètres. L'impossibilité actuelle de faire converger les théories du transfert de charge dans l'ADN est étroitement liée à la méconnaissance des particularités de chaque modèle, ce qui rend difficile leur comparaison.

Les perspectives de suite à notre projet sont nombreuses. Dans un premier temps il faut jouer sur les modes de liaison du photosensibilisateur à l'ADN, afin de discuter des performances de transfert de charge selon les différentes structures. La connaissance des interactions structurales entre l'ADN et la quinone serait utile, de même que la mesure des cinétiques de réaction des quinones dans l'ADN avec les bases et l'oxygène.

Afin d'étudier l'oxydation de l'ADN à distance du photosensibilisateur il faut s'assurer d'obtenir un transfert de charge efficace, et qui n'est pas en compétition avec la formation de pontages. Alors, la mesure de la consommation des quatre bases de l'ADN pourra être mesurée de nouveau, et il sera possible d'étudier les effets de séquence sur l'oxydation globale de l'ADN par transfert de charge.

## **Annexe : Clivage des Guanines oxydées dans l'ADN et visualisation des distances de transfert**

Lors des expériences d'études du transfert de charge dans l'ADN, les distances de transfert sont adéquatement mesurées par électrophorèse. Dans le duplexe d'ADN, le brin qui porte les G est marqué enzymatiquement au  $^{32}\text{P}$ , qui est un émetteur de photons bétas. De cette façon l'ADN est repéré sur un gel de polyacrylamide dénaturant, après exposition plusieurs heures sur un écran sensible aux bétas. Les guanines oxydées par le transfert de charge sont converties en coupures de brin par traitement à chaud de l'ADN photolysé par 1 M de pipéridine aqueuse. La pipéridine est basique et mène au départ des bases oxydées par hydrolyse du lien *N*-glycosidique, car celles-ci ont généralement perdu de la densité électronique sur leur hétérocycle (Burrows et Muller. 1998). Les sites abasiques obtenus sont à leur tour sensibles au traitement basique, et par élimination  $\beta$  du groupement phosphate en C2', la cassure du brin d'ADN est obtenue (**Figure annexe 1**). Par conséquent le brin d'ADN est coupé à l'endroit où il y a eu une G oxydée. Lors de l'électrophorèse, la différence de potentiel appliquée au gel dénaturant sépare les différents fragments d'ADN selon leur taille, et les fragments apparaissent comme des bandes noires après révélation du gel (voir figure 1 de l'article 1). La taille des fragments est obtenue en comparant la migration des bandes à une échelle de taille préalablement préparée. La taille des fragments donne directement la distance de transfert de charge oxydatif qui s'est produite entre la guanine et l'oxydant lié à l'ADN, et l'intensité de la bande indique la proportion d'oxydation qui a eu lieu sur la base.



**Figure annexe 1: élimination  $\beta$  induite par une amine (adapté de (Burrows et Muller, 1998)).**

## Remerciements

Cette thèse n'a pas toujours été une partie de plaisir. Les difficultés rencontrées m'ont fait souvent grincer des dents, taper du pied, ainsi que me gratter le dessus du crâne avec le résultat que l'on connaît. Mais par chance, et je le répète, les deux anglophones qui m'encadraient sont passionnés et passionnants, même si un tel compliment fait rougir le faussement timide Darel. Richard n'a jamais perdu espoir dans nos expérimentations même les plus brumeuses et sa ténacité reste pour moi un exemple à suivre. Darel a toujours été d'une aide précieuse, une aide à la fois scientifique par son savoir incroyable dans de nombreux domaines et une aide morale par sa bonne humeur connue bien au-delà du département (sauf dans les semaines précédant les dates limites de demandes de fonds). Darel a tenu une part active dans l'animation des quelques 1500 dîners que nous avons pris dans la "belle" salle à manger du département. Grâce à lui les repas m'ont souvent permis de garder mes connaissances à jour dans divers domaines essentiels de la vie tels que les stratégies de lutte contre la cellulite, la bourse, les pièces d'auto, et bien sûr, son hobby préféré: la découverte et l'emploi hors contexte de nombreuses expressions imagées québécoises. Darel est le plus grand anglophone québécois au monde. Je n'oublierai pas ses nombreuses partys cabane à sucre, ses festivals des films modestes, ses 5 à 7 gaufres/crêpes copieusement arrosées de sirop d'érable (et surtout pas de sirop de poteau), la plantation chez lui, (en équipe, heureusement) de plusieurs centaines d'arbres, les pique-niques dans le bois, au même endroit où les ours gisent ou font autre chose qui rime avec gisent (cheese ?)

L'épopée de cette thèse a en fait commencée dès ma tombée du bus en provenance de Montréal, pour moi petit français débarqué le 9 Octobre 2000 en Amérique, un peu en retard sur J.C. (Jacques Cartier, le monsieur des ponts et des parcs dans toutes les villes du Québec). Aussitôt pris en charge par le Gaspésien sans accent<sup>©</sup> (modèle déposé) Sébastien Tremblay, qui nous prêta mon coloc Johann et moi, chaises, fourchettes, radio, en plus de nous donner une formation intensive en HPLC. Sebas a récemment avoué qu'il regardait McGyver quand il était petit: tout s'explique. Il vous manque une patente pour filtrer, distiller, dialyser, changer le seal-pack ou réparer cette maudite fuite ? Appelez Sebas, il se fera un plaisir de vous rendre service. Et un modèle de patience, en plus. Une fois je l'ai vu pogner les nerfs, oui, je vous jure...Guillaume Ratelle, lui, en avait tout un accent. Heureusement il l'a toujours, mais maintenant je peux le comprendre, et pas faire semblant comme on fait au début en arrivant au Québec. Après avoir fini sa maîtrise en manipant jusque tard le soir, Guillaume s'est rapidement chargé de faire visiter les meilleurs bars de Sherbrooke, puis ceux de Montréal. À notre demande, les grands succès de Joe Dassin ont été plus souvent joués à la boîte à Marius. Grâce à Guillaume j'ai aussi appris à choisir un rapala, une caisse de 24, des barres tendres, et à finalement uriner proprement d'une chaloupe, même avec une bonne houle, ce qui constitue les piliers d'un voyage de pêche réussi (d'où quelques refrains célèbres comme: on fait-tu un beau voyage ? où encore: c'est un parfait aux petits fruits). À nos dépend, j'ai aussi appris qu'une chaloupe non attachée ne revient pas toute seule même si on l'appelle...(mais chut c'est un secret), et qu'il vaut mieux avoir des pneus d'hiver + des chaînes ou un 4x4 pour aller faire des belles photos des chutes Windigo gelées (que c'était beau, mais un peu cher le towing). Aux côtés de Guil j'ai aussi appris qu'à 3h du matin sur la Well il n'y a pas que des gens à jeun et philanthropes, et qu'il faut parfois combattre avant de déguster sa

poutine chez Pap's (smoke meat, svp). C'est dans sa phase plus sérieuse que j'ai connu Sylvain Cecchini, arrivant apparemment trop tard à Sherbrooke pour le voir crouser dans les bars. Un autre qui ne s'énervé jamais (c'est énervant!), travaille dur, et est très sympathique. On a du mal à le croire de Paris. L'influence italienne, sûrement. La même influence qui le poussa un jour à ramener un jambon sec entier de France dans ses bagages, au nez et à la barbe des douaniers et leurs chiens, tandis que nous devions ici nous contenter de salami tchèque made in Canada. Sylvain m'a entre autre appris à utiliser un MALDI modèle 14-18 avec canon de 75 mm, crosse en bois et 3 m de recul (à n'utiliser qu'à  $6.10^{-6}$  Torr), à couler un gel qui ne coule pas, à ne pas m'irradier au  $^{32}\text{P}$ , à écrire toutes mes manip sur des papiers bruns jetables, à aller voir les gens dans les labs qui ont les machines qui nous intéressent, bref, à faire avancer mon doctorat malgré le manque criant de matériel. (Sylvain, j'espère que notre projet d'automatisation du marquage de l'ADN tient toujours !) L'ambiance du département ne serait pas la même sans la contribution inestimable de Daniel Robillard, qui est officiellement informaticien, mais officieusement maître de divers "pools" (dékéssé ?) Un peu comme dans l'ambiance enfumée des tripots clandestins, nous parions grâce à Dan toutes nos économies sur l'issue fatale du classement de la LNH ou de la Formule 1. Certains même ont gagé sur des élections, mais oui. Le but dans tout ça étant d'impliquer les membres du département dans des discussions hockeylistiques (le plus souvent). Et ça marche. Un des mes plus grands plaisirs de couloirs est de commenter les performantes désastreuses du CH (les occasions ont été nombreuses en 6 ans, pas de coupe à l'horizon de la sainte-flanelle). Dan est aussi le Gentil Organisateur de diverses sorties de ski, il paraît même qu'il a donné récemment des cours d'initiation à une postdoc serbe, pour leur plus grand plaisir ! Ah au fait Dan, j'aurai bien voulu, comme tu sais, t'accompagner à St-Martin pour faire de la voile, mais bon, la conjoncture économique mondiale étant ce qu'elle est...

Je dois évidemment rendre l'hommage qu'il se doit au barbu de Princeville, l'homme qui s'enveloppe dans des foulards qui pourraient servir à enturbanner une momie tellement ils sont longs (mais c'est pas lui qui les tricote, dit-il). Jean-François a sans aucun doute été conçu pour jouer à tous les jeux existants: Mississipi, billard, Buffalo (ce jeu ne l'aide pas à rester sobre), et bien sûr Baby-foot et Ultimate Freezbee. Il a une étrange passion qui se révèle les lendemains de Saint-Jean: traverser une rivière d'eau fraîche à la nage. À propos de Saint-Jean, je dois souligner qu'en compagnie de J-F et de sa bande (les Gab, Anne-Marie, Marie-Ève, Rouleau, Mel, Mathieu, Brian, Alan, Carl, Merlin-à-qui-il-faut-donner-l'heure-s'il-l'a-demande et j'en oublie) le Québec a été très bien fêté. Ici je pourrais parler de la passion de Gab pour l'escalade des arbres solitaires mais il faut que je fasse un tri. Grâce à J-F, ma thèse a été ponctuée de nombreux divertissements, comme les soirées au Kudsak (qui avaient le pouvoir de faire disparaître les samedi), pendant lesquelles j'ai pu fignoler mon "redoutable" tir de volée. Évidemment difficile de dissocier le grand Phil de ces festivités. Phil, "the Roo is on fire", compagnon de parties de Playstation à des heures tardives, entrecoupées de dégustation de bonne pizzas Stratos et quelques Galpoutes, toujours apportées rapidement (heu, des fois non) par de sympathiques, mais néanmoins anciens militaires serbes. Avec Phil, nous avons même poussé l'obsession de voir jouer le Canadien de Montréal jusqu'à pénétrer en douce dans la salle d'attente du CRC, vide, quelques vendredis et samedis soirs. Je suis toujours resté perplexes devant les choix cinématographiques de Phil, qui m'ont menés à découvrir des chefs-d'oeuvres (?) tels que Naked Lunch et Blue Velvet.

Je me dois aussi d'avoir une pensée amicale pour toutes ceux et celles que j'ai croisé (ou plus si affinités) lors de ce doctorat, en vrac: Sonia, qui a su rester patiente devant mon désordre sur sa paillasse, Marie-ève, qui, je l'espère, va publier plein de papiers avec mon nom, Vandana pareil, Carole, Lamia, Pierre, Étienne et les disparus Antonio, Wesley, Tibi, Zahary, Michel Fournier, Marjorie (?), Pierre Lévesque; les membres des diverses équipes de hockey dont la plus célèbre: MAD. Sans oublier Badia, Dominic, Pascale... Chapeau aux secrétaire compétentes Pierrette, Francine, Johanne, et à quelques profs parlables (Mickael, Johan, Michel Barrette, Jean-Paul, Daniel, Benôit).

Je tiens aussi à remercier tous les évaluateurs de ma thèse et particulièrement Jean Cadet et Pierre Lavigne pour leurs précieux commentaires, dans le texte et aussi après la soutenance. Faut-il que je remercie aussi mes parents, comme à Hollywood ? OK et bien merci mes chers parents, j'espère que vous prendrez tout le mérite qui vous revient dans l'accomplissement de cette thèse, qui est une bonne part de ma vie (6 ans sur 30, ça fait 20% quand même, loin de vous mais sans que j'oublie la part que vous avez joué dans mes études, même si ça n'a pas été facile vers mes 18-20 ans). J'espère que vous ne trouverez pas trop de fautes d'orthographe...

Un salut aussi au Pita Pit, au Pot-au-Feu, à Stratos pour la bouffe, au Pierre-Jean-Jase, Bla-Bla et Choux de Bruxelles pour les repas, que dire des cafétérias du CHU, rien, c'est préférable, quand je pense que Sodexho est une compagnie française, c'est une honte messieurs dames.

Enfin, étudier à Sherbrooke m'a permis de rencontrer Marie-Hélène, ma compagne, ainsi que ses filles, qui ont gracieusement été fournies avec, comme dans un kit famille. Simplement pour ça, venir à Sherbrooke était une bonne idée.

## References

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D., Eds.; *Molecular biology of the cell*; Garland Publishing, Inc: New York, 1994; , pp 1294.
- Armitage, B., Yu, C. J., Devadoss, C. and Schuster, G. B. (1994) Cationic Anthraquinone Derivatives as Catalytic Dna Photonucleases - Mechanisms for Dna-Damage and Quinone Recycling. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 9847-9859.
- Barnett, R. N., Cleveland, C. L., Joy, A., Landman, U. and Schuster, G. B. (2001) Charge Migration in DNA: Ion-Gated Transport. *Science*. **294**, 567-571.
- Bellon, S., Ravanat, J. L., Gasparutto, D. and Cadet, J. (2002) Cross-Linked Thymine-Purine Base Tandem Lesions: Synthesis, Characterization, and Measurement in Gamma-Irradiated Isolated DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **15**, 598-606.
- Boone, E. et Schuster, G. B. (2002) Long-Range Oxidative Damage in Duplex DNA: The Effect of Bulged G in a G-C Tract and Tandem G/A Mispairs. *Nucleic Acids Res.* **30**, 830-837.
- Breslin, D. T. et Schuster, G. B. (1996) Anthraquinone Photonucleases: Mechanisms for GG-Selective and Nonselective Cleavage of Double-Stranded DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2311-2319.
- Burrows, C. J. et Muller, J. G. (1998) Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chem. Rev.* **98**, 1109-1151.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T. and Ravanat, J. L. (1997) Oxidative Damage to DNA: Formation, Measurement, and Biological Significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **131**, 1-87.
- Cadet, J., Berger, M., Buchko, G. W., Joshi, P. C., Raoul, S. and Ravanat, J. L. (1994) 2,2-Diamino-4-[(3,5-Di-O-Acetyl-2-Deoxy-Beta-D-erythropentofuranosyl) Amino]-5-(2H)-Oxazolone - a Novel and Predominant Radical Oxidation-Product of 3',5'-Di-O-Acetyl-2'-Deoxyguanosine. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7403-7404.
- Candeias, L. P. et Steenken, S. (1989) Structure and Acid-Base Properties of One-Electron-Oxidized Deoxyguanosine, Guanosine, and 1-Methylguanosine. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 1094-1099.
- Cecchini, S., Girouard, S., Huels, M. A., Sanche, L. and Hunting, D. J. (2005a) Interstrand Cross-Links: A New Type of Gamma-Ray Damage in Bromodeoxyuridine-Substituted DNA. *Biochemistry (N. Y.)*. **44**, 1932-1940.

- Cecchini, S., Masson, C., La Madeleine, C., Huels, M. A., Sanche, L., Wagner, J. R. and Hunting, D. J. (2005b) Interstrand Cross-Link Induction by UV Radiation in Bromodeoxyuridine-Substituted DNA: Dependence on DNA Conformation. *Biochemistry (N. Y.)*. **44**, 16957-16966.
- Chatterjee, M. et Rokita, S. E. (1991) Sequence-Specific Alkylation of DNA Activated by an Enzymatic Signal. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 5116-5117.
- Chatterjee, M. et Rokita, S. E. (1990) Inducible Alkylation of DNA using an Oligonucleotide Quinone Conjugate. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 6397-6399.
- Chatterjee, M. et Rokita, S. E. (1994) The Role of a Quinone Methide in the Sequence-Specific Alkylation of DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 1690-1697.
- Decarroz, C., Wagner, J. R., vanLier, J. E., Krishna, C. M., Riesz, P. and Cadet, J. (1986) Sensitized Photooxidation of Thymidine by 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone - Characterization of the Stable Photoproducts. *Int. J. Radiat. Biol.* **50**, 491-505.
- Dohno, C., Stemp, E. D. A. and Barton, J. K. (2003) Fast Back Electron Transfer Prevents Guanine Damage by Photoexcited Thionine Bound to DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 9586-9587.
- Douki, T.; Ravanat, J. L.; Angelov, D.; Wagner, J. R.; Cadet, J. *Effects of duplex stability on charge-transfer efficiency within DNA*; Schuster, G. B., Ed.; *dans: Long-range charge transfer in DNA I*; Springer: Heidelberg, 2004; Vol. 236, pp 1-25.
- Douki, T., Angelov, D. and Cadet, J. (2001) UV Laser Photolysis of DNA: Effect of Duplex Stability on Charge-Transfer Efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 11360-11366.
- Douki, T. et Cadet, J. (1999) Modification of DNA Bases by Photosensitized One-Electron Oxidation. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 571-581.
- Douki, T., Laporte, G. and Cadet, J. (2003) Inter-Strand Photoproducts are Produced in High Yield within A-DNA Exposed to UVC Radiation. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3134-3142.
- Dronkert, M. L. G. et Kanaar, R. (2001) Repair of DNA Interstrand Cross-Links. *Mutation Research-DNA Repair.* **486**, 217-247.
- Fahlman, R. P., Sharma, R. D. and Sen, D. (2002) The Charge Conduction Properties of DNA Holliday Junctions Depend Critically on the Identity of the Tethered Photooxidant. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 12477-12485.



- Fisher, G. J. et Land, E. J. (1983) Photosensitization of Pyrimidines by 2-Methylnaphthoquinone in Water: A Laser Flash Photolysis Study. *Photochem Photobiol.* 37, 27-32.
- Friese, V., Boos, A., Bauch, H. -. and Leistner, E. (1993) Biosynthesis of Axenomycin D: Incorporation of  $^{13}\text{C}$ -Labelled Precursors into the Menadione Chromophore, Deoxysugars and the Axenolide. *Phytochemistry.* 32, 613-622.
- Gasper, S. M. et Schuster, G. B. (1997) Intramolecular Photoinduced Electron Transfer to Anthraquinones Linked to Duplex DNA: The Effect of Gaps and Traps on Long-Range Radical Cation Migration. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 12762-12771.
- Giese, B. *Hole Injection and Hole Transfer through DNA: The Hopping Mechanism*; Schuster, G. B., Ed.; dans: *Long-range charge transfer in DNA I*; Springer: Heidelberg, 2004; Vol. 236, pp 27-44.
- Giese, B. (2002) Long-Distance Electron Transfer through DNA. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 51-70.
- Griffey, R. H. (1996) 2'-O-Aminopropyl Ribonucleotides: A Zwitterionic Modification that Enhances the Exonuclease Resistance and Biological Activity of Antisense Oligonucleotides. *J. Med. Chem.* 39, 5100-5109.
- Hall, D. B., Holmlin, R. E. and Barton, J. K. (1996) Oxidative DNA Damage through Long-Range Electron Transfer. *Nature.* 382, 731-735.
- Henderson, P. T., Jones, D., Hampikian, G., Kan, Y. Z. and Schuster, G. B. (1999) Long-Distance Charge Transport in Duplex DNA: The Phonon-Assisted Polaron-Like Hopping Mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8353-8358.
- Holmlin, R. E., Dandliker, P. J. and Barton, J. K. (1997) Charge Transfer through the DNA Base Stack. *Angew. Chem. Int. Ed.* 36, 2715-2730.
- Hong, I. S. et Greenberg, M. M. (2005) Efficient DNA Interstrand Cross-Link Formation from a Nucleotide Radical. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 3692-3693.
- Joseph, J. et Schuster, G. B. (2006) Emergent Functionality of Nucleobase Radical Cations in Duplex DNA: Prediction of Reactivity using Qualitative Potential Energy Landscapes. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 6070-6074.
- Joy, A., Ghosh, A. K. and Schuster, G. B. (2006) One-Electron Oxidation of DNA Oligomers that Lack Guanine: Reaction and Strand Cleavage at Remote Thymine by Long-Distance Radical Cation Hopping. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 5346-5347.
- Kanvah, S. et Schuster, G. B. (2005) The Sacrificial Role of Easily Oxidizable Sites in the Protection of DNA from Damage. *Nucleic Acids Res.* 33, 5133-5138.

- Kawai, K. et Majima, T. *Hole Transfer in DNA by Monitoring the Transient Absorption of Radical Cations of Organic Molecules Conjugated to DNA*; Schuster, G. B., Ed.; dans: *Long-range charge transfer in DNA I*; Springer: Heidelberg, 2004; Vol. 236, pp 117-137.
- Kawai, K., Osakada, Y., Fujitsuka, M. and Majima, T. (2005) Consecutive Adenine Sequences are Potential Targets in Photosensitized DNA Damage. *Chem. Biol.* **12**, 1049-1054.
- Kawai, K., Takada, T., Nagai, T., Cai, X. C., Sugimoto, A., Fujitsuka, M. and Majima, T. (2003a) Long-Lived Charge-Separated State Leading to DNA Damage through Hole Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 16198-16199.
- Kawai, K., Takada, T., Tojo, S. and Majima, T. (2003b) Kinetics of Weak Distance-Dependent Hole Transfer in DNA by Adenine-Hopping Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6842-6843.
- Kelley, S. O. et Barton, J. K. (1999) Electron Transfer between Bases in Double Helical DNA. *Science*. **283**, 375-381.
- Kelley, S. O., Holmlin, R. E., Stemp, E. D. A. and Barton, J. K. (1997) Photoinduced Electron Transfer in Ethidium-Modified DNA Duplexes: Dependence on Distance and Base Stacking. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 9861-9870.
- Kobertz, W. R. et Essigmann, J. M. (1997) Solid-Phase Synthesis of Oligonucleotides Containing a Site-Specific Psoralen Derivative. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 5960-5961.
- Kobertz, W. R. et Essigmann, J. M. (1996) Total Synthesis of a Cis-Syn 2-Carbomethoxypsoralen Furan-Side Thymidine Monoadduct. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 7101-7107.
- Krishna, C. M., Decarroz, C., Wagner, J. R., Cadet, J. and Riesz, P. (1987) Menadione Sensitized Photooxidation of Nucleic-Acid and Protein Constituents - an Electron-Spin-Resonance and Spin-Trapping Study. *Photochem. Photobiol.* **46**, 175-182.
- Lamson, D. W. et Plaza, S. M. (2003) The Anticancer Effects of Vitamin K. *Altern. Med. Rev.* **8**, 303-318.
- Lewis, F. D., Kalgutkar, R. S., Wu, Y. S., Liu, X. Y., Liu, J. Q., Hayes, R. T., Miller, S. E. and Wasielewski, M. R. (2000) Driving Force Dependence of Electron Transfer Dynamics in Synthetic DNA Hairpins. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 12346-12351.
- Lewis, F. D., Liu, J. Q., Zuo, X. B., Hayes, R. T. and Wasielewski, M. R. (2003) Dynamics and Energetics of Single-Step Hole Transport in DNA Hairpins. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4850-4861.

- Lewis, F. D. et Wasielewski, M. R. *Dynamics and Equilibrium for Single Step Hole Transport Processes in Duplex DNA*; Schuster, G. B., Ed.; dans: *Long-range charge transfer in DNA I*; Springer: Heidelberg, 2004; Vol. 236, pp 45-65.
- Liu, C. S., Hernandez, R. and Schuster, G. B. (2004) Mechanism for Radical Cation Transport in Duplex DNA Oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2877-2884.
- Ly, D., Sanii, L. and Schuster, G. B. (1999) Mechanism of Charge Transport in DNA: Internally-Linked Anthraquinone Conjugates Support Phonon-Assisted Polaron Hopping. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 9400-9410.
- Mac, M. et Wirz, J. (2002) Salt Effects on the Reactions of Radical Ion Pairs Formed by Electron Transfer Quenching of Triplet 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone by Amines. Optical Flash Photolysis and Step-Scan FTIR Investigations. *Photochemical & Photobiological Sciences.* **1**, 24-29.
- Melvin, T., Cunniffe, S. M. T., O'Neill, P., Parker, A. W. and Roldan-Arjona, T. (1998) Guanine is the Target for Direct Ionisation Damage in DNA, as Detected using Excision Enzymes. *Nucleic Acids Res.* **26**, 4935-4942.
- Murphy, C. J., Arkin, M. R., Jenkins, Y., Ghatlia, N. D., Bossmann, S. H., Turro, N. J. and Barton, J. K. (1993) Long-Range Photoinduced Electron-Transfer through a Dna Helix. *Science.* **262**, 1025-1029.
- Nakatani, K., Dohno, C. and Saito, I. (2001) Design of a Hole-Trapping Nucleobase: Termination of DNA-Mediated Hole Transport at N-2-Cyclopropyldeoxyguanosine. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 9681-9682.
- Nakatani, K., Dohno, C. and Saito, I. (2000) Modulation of DNA-Mediated Hole-Transport Efficiency by Changing Superexchange Electronic Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 5893-5894.
- Nakatani, K. et Saito, I. (2004) Charge Transport in Duplex DNA Containing Modified Nucleotide Bases. *Long-Range Charge Transfer in Dna i.* **236**, 163-186.
- Noll, D. M., Mason, T. M. and Miller, P. S. (2006) Formation and Repair of Interstrand Cross-Links in DNA. *Chem. Rev.* **106**, 277-301.
- O'Neill, M. A. et Barton, J. K. (2004a) DNA Charge Transport: Conformationally Gated Hopping through Stacked Domains. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11471-11483.
- O'Neill, M. A.; Barton, J. K. *DNA-mediated charge transport chemistry and biology*; Schuster, G. B., Ed.; dans: *Long-range charge transfer in DNA I*; Springer: Heidelberg, 2004b; Vol. 236, pp 67-115.
- O'Neill, M. A. et Barton, J. K. (2002) 2-Aminopurine: A Probe of Structural Dynamics and Charge Transfer in DNA and DNA : RNA Hybrids. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 13053-13066.

- Romieu, A., Bellon, S., Gasparutto, D. and Cadet, J. (2000) Synthesis and UV Photolysis of Oligodeoxynucleotides that Contain 5-(Phenylthiomethyl)-2'-Deoxyuridine: A Specific Photolabile Precursor of 5-(2'-Deoxyuridyl)Methyl Radical. *Org. Lett.* 2, 1085-1088.
- Saito, I., Takayama, M., Sugiyama, H. and Nakatani, K. (1995) Photoinduced DNA Cleavage Via Electron-Transfer - Demonstration that Guanine Residues Located 5' to Guanine are the most Electron-Donating Sites. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 6406-6407.
- Sanii, L. et Schuster, G. B. (2000) Long-Distance Charge Transport in DNA: Sequence-Dependent Radical Cation Injection Efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 11545-11546.
- Santhosh, U. et Schuster, G. B. (2002) Long-Range Charge Transport in Duplex DNA: Anthraquinone Sensitization Results are Independent of Terminal Ionic Distribution. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 10986-10987.
- Scharer, O. D. (2005) DNA Interstrand Crosslinks: Natural and Drug-Induced DNA Adducts that Induce Unique Cellular Responses. *Chembiochem.* 6, 27-32.
- Schlientz, N. W. et Schuster, G. B. (2003) Long-Distance Radical Cation Migration in Duplex DNA: The Effect of Contiguous A Center Dot A and T Center Dot T Mismatches on Efficiency and Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 15732-15733.
- Schuster, G. B. (2000) Long-Range Charge Transfer in DNA: Transient Structural Distortions Control the Distance Dependence. *Acc. Chem. Res.* 33, 253-260.
- Schuster, G. B.; Landman, U. *The mechanism of long-distance radical cation transport in duplex DNA: ion-gated hopping of polaron-like distortions*; Schuster, G. B., Ed.; dans: *Long-range charge transfer in DNA I*; Springer: Heidelberg, 2004; Vol. 236, pp 139-162.
- Shafirovich, V. et Geacintov, N. E. *Proton-Coupled Electron Transfer Reactions at a Distance in DNA Duplexes*. Schuster, G. B., Ed.; dans: *Long-range charge transfer in DNA II*; Springer: Heidelberg, 2004; Vol. 237, pp 129-157.
- Shao, F. W., Augustyn, K. and Barton, J. K. (2005) Sequence Dependence of Charge Transport through DNA Domains. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 17445-17452.
- Shao, F. W., O'Neill, M. A. and Barton, J. K. (2004) Long-Range Oxidative Damage to Cytosines in Duplex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17914-17919.
- Snyder, C. D. et Rapoport, H. (1974) Synthesis of Menaquinones. *J. Am. Chem. Soc.* 96, 8046-8054.

- Spassky, A. et Angelov, D. (2002) Temperature-Dependence of UV Laser One-Electron Oxidative Guanine Modifications as a Probe of Local Stacking Fluctuations and Conformational Transitions. *J. Mol. Biol.* 323, 9-15.
- Spassky, A. et Angelov, D. (1997) Influence of the Local Helical Conformation on the Guanine Modifications Generated from One-Electron DNA Oxidation. *Biochemistry (N. Y.)*. 36, 6571-6576.
- Steenken, S. (1989) Purine-Bases, Nucleosides, and Nucleotides - Aqueous-Solution Redox Chemistry and Transformation Reactions of their Radical Cations and e- and OH Adducts. *Chem. Rev.* 89, 503-520.
- Steenken, S. et Jovanovic, S. V. (1997) How Easily Oxidizable is DNA? One-Electron Reduction Potentials of Adenosine and Guanosine Radicals in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 617-618.
- Stemp, E. D. A., Arkin, M. R. and Barton, J. K. (1997) Oxidation of Guanine in DNA by Ru(Phen)(2)(Dppz)(3+) using the Flash-Quench Technique. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 2921-2925.
- Sugiyama, H., Tsutsumi, Y. and Saito, I. (1990) Highly Sequence Selective Photoreaction of 5-Bromouracil-Containing Deoxyhexanucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 6720-6721.
- Tremblay, S., Douki, T., Cadet, J. and Wagner, J. R. (1999) 2'-Deoxycytidine Glycols, a Missing Link in the Free Radical-Mediated Oxidation of DNA. *J. Biol. Chem.* 274, 20833-20838.
- Turro, N. J. et Barton, J. K. (1998) Paradigms, Supermolecules, Electron Transfer and Chemistry at a Distance. What's the Problem? The Science Or the Paradigm? *J. Biol. Inorg. Chem.* 3, 201-209.
- Vicic, D. A., Odom, D. T., Nunez, M. E., Gianolio, D. A., McLaughlin, L. W. and Barton, J. K. (2000) Oxidative Repair of a Thymine Dimer in DNA from a Distance by a Covalently Linked Organic Intercalator. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 8603-8611.
- Wagner, J. R., Berger, M., Cadet, J. and vanLier, J. E. (1990) Analysis of Thymidine Hydroperoxides by Postcolumn Reaction High-Performance Liquid-Chromatography. *J. Chromatogr.* 504, 191-196.
- Wagner, J. R., Cadet, J. and Fisher, G. J. (1984) Photo-Oxidation of Thymine Sensitized by 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone: Analysis of Products Including Three Novel Photo-Dimers. *Photochem. Photobiol.*, 589-597.
- Wagner, J. R., Decarroz, C., Berger, M. and Cadet, J. (1999) Hydroxyl-Radical-Induced Decomposition of 2'-Deoxycytidine in Aerated Aqueous Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 4101-4110.

- Wagner, J. R., Hu, C. C. and Ames, B. N. (1992) Endogenous Oxidative Damage of Deoxycytidine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 3380-3384.
- Wagner, J. R., vanLier, J. E., Berger, M. and Cadet, J. (1994) Thymidine Hydroperoxides - Structural Assignment, Conformational Features, and Thermal-Decomposition in Water. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 2235-2242.
- Wagner, J. R., vanLier, J. E., Decarroz, C., Berger, M. and Cadet, J. (1990a) Photodynamic Methods for Oxy Radical-Induced Dna-Damage. *Meth. Enzymol.* 186, 502-511.
- Wagner, J. R., vanLier, J. E. and Johnston, L. J. (1990b) Quinone Sensitized Electron-Transfer Photooxidation of Nucleic-Acids - Chemistry of Thymine and Thymidine Radical Cations in Aqueous-Solution. *Photochem. Photobiol.* 52, 333-343.
- Wan, C. Z., Fiebig, T., Schiemann, O., Barton, J. K. and Zewail, A. H. (2000) Femtosecond Direct Observation of Charge Transfer between Bases in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 14052-14055.
- Wang, Y. S. et Liu, Z. J. (2002) Mechanisms for the Formation of Major Oxidation Products of Adenine upon 365-Nm Irradiation with 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone as a Sensitizer. *J. Org. Chem.* 67, 8507-8512.
- Wilds, C. J., Noronha, A. M., Robidoux, S. and Miller, P. S. (2004) Mismatch-Aligned (NT)-T-3-Alkyl-(NT)-T-3 Interstrand Cross-Linked DNA: Synthesis and Characterization of Duplexes with Interstrand Cross-Links of Variable Lengths. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 9257-9265.
- Williams, T. T. et Barton, J. K. (2002) The Effect of Varied Ion Distributions on Long-Range DNA Charge Transport. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 1840-1841.
- Williams, T. T., Dohno, C., Stemp, E. D. A. and Barton, J. K. (2004) Effects of the Photooxidant on DNA-Mediated Charge Transport. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 8148-8158.
- Williams, T. T., Odom, D. T. and Barton, J. K. (2000) Variations in DNA Charge Transport with Nucleotide Composition and Sequence. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 9048-9049.
- Yavin, E., Boal, A. K., Stemp, E. D. A., Boon, E. M., Livingston, A. L., O'Shea, V. L., David, S. S. and Barton, J. K. (2005) Protein-DNA Charge Transport: Redox Activation of a DNA Repair Protein by Guanine Radical. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3546-3551.
- Zeng, Q. P. et Rokita, S. E. (1996) Tandem Quinone Methide Generation for Cross-Linking DNA. *J. Org. Chem.* 61, 9080-9081.